Entwicklung von diagnostischen Assays

mit Magnetic Beads und

frequenzmischungs-basierter Detektion

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Martin H. F. Meyer

aus Mülheim a. d. Ruhr

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 18. November 2008 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. Keusgen

Zweitgutachter: Prof. Dr. G. Klebe

Tag der mündlichen Prüfung am 19. November 2008.

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön an Herrn Prof. Dr. Keusgen für die freundliche Überlassung des spannenden Themas und die wissenschaftliche und persönliche Betreuung während dieser interessanten Zeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Klebe für die Übernahme des Zweitgutachtens und gute Gespräche auf den typischen Wegen des 2. OG.

Danken möchte ich auch allen Arbeitskollegen der AG Keusgen für die nette gemeinsame Zeit und viele lustige Momente, verteilt über 3 Labore, 2 Gebäude und einen Umzug.

Auch allen Assistenten des 2. Semesters sowie Herrn PD Dr. Reuter gilt mein Dank für schöne, lehr- und erkenntnisreiche Semesterstunden und ca. hundert Variationen der Frage „Ist das richtig so?“

Ein abschließender Dank an meine Familie und Freunde, von deren Unterstützung ich profitiert habe und ohne deren psychische und physische Motivation diese Arbeit nicht fertig geworden wäre!

1 EINLEITUNG 1

1.1 Biosensoren 1

1.2 Detektion mit spezifischen Biomolekülen 4

1.3 Immobilisierung von Biomolekülen 5

1.4 Antikörper 6

1.5 Phagenproteine als Detektionsmoleküle 13

1.6 Diagnostische Immunoassays 18

1.7 Grundlagen der Analyten 21
1.7.1 Das C-reaktive Protein 21
1.7.2 *Yersinia pestis* 23
1.7.3 *Francisella tularensis* 26
1.7.4 *Clostridium botulinum* 29
1.7.5 *Mycobacterium paratuberculosis* 33
1.7.6 *Salmonella typhimurium* 36

1.8 Übersicht der verwendeten Messtechniken 40
1.8.1 Oberflächenplasmonresonanz 40
1.8.2 Magnetic Beads 43
1.8.3 Magnetische Detektion 45

1.9 Zielsetzung 49

2 MATERIAL UND METHODEN 51

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterial und Software 51

2.2 Chemikalien und Reaktionskits 51

2.3 Magnetic Beads 52

2.4 Antikörper und Antigene 53

2.5 Puffer und Lösungen 54
2.5.1 Reaktionspuffer 54
2.5.2 Herstellung kompetenter Zellen 54
2.5.3 Färbe- und Fixierlösungen 55
2.5.6 FPLC 55
2.5.7 Zellaufschluss und Waschpuffer 55

2.6 Medien 56

2.7 Enzyme und Standards 57

2.8 Gene und Plasmide 57

2.9 Organismen 58

2.10 Herstellung biosensitiver Schichten 58
2.10.1 Vorbereitung der Träger 58
2.10.2 Adsorptive Beschichtung 59

2.10.3 Herstellung einer Aminooberfläche ... 60
2.10.4 Alkylierung ... 62
2.10.5 Biotinylierung ... 63
2.10.6 Kovalente Kopplung von Biomolekülen ... 64

2.11 Modifizierung von Biomolekülen ... 71
2.11.1 Biotinylierung an einer Aminogruppe ... 71
2.11.2 Biotinylierung an einer Carboxylgruppe ... 72

2.12 Molekularbiologische Methoden ... 73
2.12.1 Herstellung Hitzeschock-kompetenter Zellen ... 73
2.12.2 Transformation von Bakterien ... 74

2.13 Kulturbedingungen ... 74
2.13.1 Stammhaltung ... 74
2.13.2 Wachstumsbedingungen ... 75

2.14 Analytik des Zellwachstums ... 75

2.15 Proteinaufarbeitung ... 75
2.15.1 Zellaufschluss ... 75
2.15.2 Aufreinigung mit der IMAC-FPLC ... 76
2.15.3 Konzentrierung ... 77
2.15.4 Dialyse ... 77

2.16 Proteinbestimmung ... 77

2.17 Polyacrylamid-Gelelektrophorese ... 78

2.18 Oberflächenplasmonresonanz (SPR) ... 79

2.19 Magnetische Detektion mit Frequenzmischung ... 81

2.20 Assays auf Basis der magnetischer Detektion mit ABICAP® Säulen ... 83
2.20.1 Sequentielle Messtechnik ... 84
2.20.2 Kombinierte magnetische Extraktion und Detektion ... 85
2.20.3 Bestimmung der Standardabweichungen eines Assays ... 85

2.21 Magnetische Detektion mit kombinierter Fluidik ... 86

2.22 Detektion des C-reaktiven Proteins auf Polystyrolchips ... 88

2.23 Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten nach EDWARDS UND LEATHERBARROW (1997) ... 90

3 ERGEBNISSE ... 92

3.1 Etablierung eines Biosensors zur Analytik des C-reaktiven Proteins (CRP) auf Basis der Oberflächenplasmonresonanz ... 92
3.1.1 Messanordnung ... 92
3.1.2 Optimierung der Messanordnung ... 94
3.1.3 Etablierung des CRP-Immunosensors ... 96
3.1.4 Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstante der Antikörper antiCRP Klon C2 mit Oberflächenplasmonresonanz ... 99

3.2 Immobilisierung des antiCRP Antikörpers Klon C2 auf Polystyrol ... 101

3.3 Versuche zur Detektion von *Mycoplasma paratuberculosis* LAM ... 105
3.3.1 Messung im Sandwich-Prinzip mit Streptavidin ... 105

3.3.2 Messung im Sandwich-Prinzip mit C18-Oberfläche 107
3.3.3 Detektion von *M. paratuberculosis* LAM mit zusätzlichen Antikörpern 109

3.4 Magnetische Detektion des C-reaktiven Proteins mit ABICAP®-Säulen 113
3.4.1 Vorversuche zur Optimierung der magnetischen Detektion 113
3.4.2 Etablierung eines Systems zur Detektion des C-reaktiven Proteins 118
3.4.3 Übertragung des CRP-Detektionssystems auf Realmatrices 130
3.4.3.1 Bestimmung von CRP in humanem Blutserum 130
3.4.3.2 Bestimmung von CRP in humaner Saliva und Urin 132
3.4.4 Vergleich der Sensorsysteme 134

3.5 Screening alternativer Magnetpartikel 138
3.5.1 Kalibrationsversuche mit neuen Magnetpartikeln 144
3.5.1.1 Kalibration mit Dynal M-270 144
3.5.1.2 Kalibration mit Dynal T1 145
3.5.1.3 Kalibration mit Estapor BM 2,6 146
3.5.1.4 Kalibration mit Seradyn dsMGSA 1,3 147

3.6 *Yersinia pestis*-Assay mit magnetischer Detektion 148
3.6.1 Optimierung des *Y. pestis*-Detektionssystems 150
3.6.2 Detektion des *Y. pestis*-Antigens in Puffer 153
3.6.3 Detektion von *Y. pestis* in humanem Blutserum 156
3.6.4 Detektion von *Y. pestis* in Kaninchenserum mit magnetischer Extraktion 159

3.7 Magnetische Detektion von *Francisella tularensis* 161
3.7.1 Optimierung des Extraktions- und Detektionsantikörpers 162
3.7.2 Etablierung und Kalibration in Puffer 164
3.7.3 Etablierung und Kalibration in Kaninchen-Serum 166
3.7.4 Detektion mit magnetischer Extraktion 169

3.8 Expression und Charakterisierung des P22 Tail Spike-Protein 172
3.8.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung 172
3.8.2 Charakterisierung 174

3.9 Diagnostik von *S. typhimurium* mit magnetischer Detektion 181
3.9.1 Detektion mit einem Sandwich-Prinzip 181
3.9.2 Direkte Detektion von *S. typhimurium* 192
3.9.2.1 Direkte Detektion mit Antikörper (pH 9,5) 194
3.9.2.2 Direkte Detektion mit Antikörper (pH 5,0) 197
3.9.2.3 Direkte Detektion mit TSP 200
3.9.2.4 Direkte Detektion mit TSP bei pH 5,0 204
3.9.3 Direkte Detektion mit einem kompetitiven Assay 207
3.9.3.1 Detektion in Puffer 210
3.9.3.2 Detektion in Realmatrix 213
3.9.3.3 Detektion mittels magnetischer Extraktion aus Realmatrix 215

3.10 Detektion von *Clostridium botulinum* 217
3.10.1 Detektion von Botox B mit SPR im Sandwich-Verfahren 218
3.10.2 Detektion von Botox B mit magnetischer Detektion 221

3.11 Aufbau einer Fluidik mit magnetischer Detektion 225
3.11.1 Detektion von CRP in Puffer 225
3.11.3 Detektion von CRP in Kaninchenserum 232

4 DISKUSSION 236

4.1 Etablierung eines Biosensors zur Analytik des C-reaktiven Proteins auf Basis der Oberflächenplasmonresonanz 236

4.2 Immobilisierung des antiCRP Antikörpers Klon C2 auf Polystyrol 242

4.3 Versuche zur Detektion von *Mycoplasma paratuberculosis* LAM 246

4.4 Magnetische Detektion des C-reaktiven Proteins mit ABICAP®-Säulen 248
4.4.1 Vorversuche zur Optimierung der magnetischen Detektion 248
4.4.2 Etablierung eines Systems zur Detektion des C-reaktiven Proteins 252
4.4.3 Übertragung des CRP-Detektionssystems auf Realmatrices 257
4.4.4 Vergleich der Sensorsysteme 259

4.5 Evaluierung alternativer Magnetpartikel 265

4.6 *Yersinia pestis*-Assay mit magnetischer Detektion 266

4.7 Magnetische Detektion von *Francisella tularensis* 270

4.8 Expression und Charakterisierung des P22 Tail-Spike-Protein 274

4.9 Diagnostik von *S. typhimurium* mit magnetischer Extraktion 277
4.9.1 Detektion im Sandwich-Prinzip 277
4.9.2 Direkte Detektion von *S. typhimurium* 279
4.9.3 Direkte Detektion mit einem kompetitiven Assay 282
4.9.4 Vergleich der Detektion von *S. typhimurium* 283

4.10 Detektion von *Clostridium botulinum* 285

4.11 Aufbau einer Fluidik mit magnetischer Detektion 290

4.12 Genereller Vergleich der Sensortechnik 297

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 300

6 ANHANG 304

7 LITERATURVERZEICHNIS 306

Abbildungsverzeichniss

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Biosensors 2
Abbildung 2 Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers..... 7
Abbildung 3 Schematische Strukturdarstellung von Immunglobulin A, M und G. 8
Abbildung 4 Enzymatische Spaltung eines IgG-Moleküls mit Papain und Pepsin..... 10
Abbildung 5 Schematische Darstellung der Hybridoma-Technik..... 12
Abbildung 6 Schematische Darstellung des Phagen T2. 15
Abbildung 7 Schematische Darstellung des Phagen P22. 16
Abbildung 8 Strukturelle Darstellung des P22 tail spike Protein (1TYX).. 17
Abbildung 9 Schematische Darstellung eines Sandwich-Assays. 20
Abbildung 10 Graphische Darstellung eines CRP-Moleküls. 21
Abbildung 11 Mikroskopische Darstellung von *Yersinia pestis.* 24
Abbildung 12 Modell-Darstellung eines *Yersinia pestis* F1-Kapsel-Proteins. 25
Abbildung 13 Elektronenmikroskopische Darstellung von *Francisella tularensis*. 27
Abbildung 14 Elektronenmikroskopische Darstellung von *Clostridium botulinum*. 29
Abbildung 15 Spaltung der Botox-Vorstufe zum fertig prozessierten Protein..... 31
Abbildung 16 Modelldarstellung des *Clostridium botulinum* Toxin B.. 32
Abbildung 17 Elektronenmikroskopische Darstellung von *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis.* 34
Abbildung 18 Elektronenmikroskopische Darstellung von *Salmonella enteritica subsp. enteritica* Serovar Typhimurium. 37
Abbildung 19 Schematische Darstellung einer Oberflächenplasmonwelle..... 40
Abbildung 20 Schematische Darstellung der Resonanzwinkeländerung eines SPR-Detektionssystems. 42
Abbildung 21 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von Magnetic Beads. 44
Abbildung 22 Restriktionskarte für Plasmid pWK407..... 57
Abbildung 23 Schematische Darstellung der H2O2 / UV-Aktivierung. 61
Abbildung 24 Schematische Darstellung der Amino-Silanisierung. 61
Abbildung 25 Schematische Darstellung der Alkylierung. 63
Abbildung 26 Schematische Darstellung der NHS/DCC-Kopplung..... 65
Abbildung 27 Schematische Darstellung der GDA-Kopplung. 66
Abbildung 28 Schematische Darstellung der FNPA-Immobilisierung. 67
Abbildung 29 Schematische Darstellung der Sulfo-HSAB-Immobilisierung..... 68
Abbildung 30 Biotinylierung mit Biotin-NHS an einer Amino-Gruppe..... 72
Abbildung 31 Biotinylierung mit EDC an Carboxylgruppen. 73
Abbildung 32 Interaktion des His6-tags eines Enzyms (links) mit der an Cellulose gebundenen Ni-NTA Matrix. 76
Abbildung 33 SPR-Gerät Plasmonic® der Hofmann Sensor Systeme GmbH..... 80
Abbildung 34 Schematische Darstellung des Sensorkopfes des Biomagnetreaders. 82
Abbildung 35 Schematische Darstellung des Fluidik-Messaufbaus. 86
Abbildung 36 Aufbau der Fluidik. 87
Abbildung 37 Polystyrolchip zur Immobilisierung.. 88
Abbildung 38 Schematische Darstellung des CRP-Assays auf Polystyrolchips. 89
Abbildung 39 Darstellung der Messanordnung für die SPR-Spektroskopie. 92
Abbildung 40 SPR-Sensogramm der Messanordnung.. 94
Abbildung 41 Vergleich zwischen Carboxy- und Aminoterminal-biotinyliertem Antikörper anti-CRP Klon C6. 95
Abbildung 42 Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen des Detektionsantikörpers antiCRP Klon C2. 96

Abbildung 43 Graphische Darstellung der Winkelveränderung durch Anlagerung des Detektionsantikörpers antiCRP Klon C2 bei verschiedenen CRP-Konzentrationen. 97
Abbildung 44 Darstellung der Winkelveränderungen bei der Vermessung verschiedener CRP Konzentrationen. 98
Abbildung 45 Linearer Messbereich des CRP Biosensors auf SPR-Basis..... 99
Abbildung 46 Graphische Ermittlung der Assoziationskonstante kass..... 100
Abbildung 47 Beispielhafte Darstellung der Fluoreszenzauswertung des CRP-Assays nach Immobilisierung des Antikörpers anti-CRP C2 auf Polystyrol. ... 101
Abbildung 48 Schematische Darstellung des ersten LAM-Messprinzips. 106
Abbildung 49 SPR-Sensogramm der Sandwich-Detektion von LAM mit Streptavidin als Ankermolekül..... 106
Abbildung 50 Schematische Darstellung des Messprinzips im Sandwich-Verfahren auf alkylierter Chip-Oberfläche..... 108
Abbildung 51 SPR-Sensogramm der Sandwich-Detektion von LAM auf alkylierter C18-Oberfläche. 108
Abbildung 52 Schematische Darstellung des Messprinzips im Sandwich-Verfahren mit zwei verschiedenen Antikörpern auf alkylierter Chip-Oberfläche..... 110
Abbildung 53 SPR-Sensogramm des Sandwich-Messprinzips mit den Antikörpern anti-MT und anti-LAM 111
Abbildung 54 SPR-Sensogramm der Kontrolle des des Sandwich-Messprinzips mit den Antikörpern anti-MT un d anti-LAM ohne LAM (Kontrollversuch).... 112
Abbildung 55 REM-Aufnahme von Magnetic Beads mit gebundenen Bakterien 115
Abbildung 56 Ergebnisse des CRP-Assays bei einer definierten Analytkonzentration mit filtrierten Beads und unter Zugabe von Casein. 116
Abbildung 57 Schematische Darstellung des Detektionsprinzip für das C-reaktiven Protein..... 119
Abbildung 58 Vergleich der Immobilisierungsstrategien für den Extraktionsantikörper anti-CRP C2 am Polyethylen-Sinterkörper 120
Abbildung 59 Variation des Immobilisierungspuffers und pH-Wertes bei adsorptiver Immobilisierung des Extraktionsantikörpers anti-CRP C2. 121
Abbildung 60 Lagerstabilität der adsorptiven Beschichtung. 122
Abbildung 61 Variation der Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-CRP C2. 123
Abbildung 62 Variation der Konzentration des Detektionsantikörpers anti-CRP C6B. 124
Abbildung 63 Variation der pH-Werte des 0,15 M Messpuffers im CRP-Assay. 125
Abbildung 64 Kalibrationsreihe des CRP-Detektionssystems in PBS-Puffer..... 126
Abbildung 65 Kalibrationsreihe des CRP-Detektionssystems in PBS-Puffer für niedrige Analyt-Konzentrationen. 127
Abbildung 66 Kalibrationsreihe des CRP-Detektionssystems in PBS-Puffer für hohe Analyt-Konzentrationen. 128
Abbildung 67 Kalibrationsreihe der CRP-Detektion mit magnetischer Extraktion. 129
Abbildung 68 Kalibrationsreihe des CRP-Detektionssystems mit sequentieller Messung in humanem Blutserum..... 131
Abbildung 69 Kalibrationsreihe des CRP-Detektionssystems mit magnetischer Extraktion in humanem Blutserum..... 132
Abbildung 70 Standardreihe des CRP-Detektionssystems mit sequentieller Messung in Blutserum, Saliva und Urin. 133
Abbildung 71 Linearer Detektionsbereich des Prototyp-Sensors im CRP-Assay..... 135
Abbildung 72 Linearer Detektionsbereich des modifizierten Sensors im CRP-Assay. 136

Abbildung 73 Vergleich lineare Detektionsbereiche für hohe CRP-Konzentrationen. 137
Abbildung 74 Konzentrations-Testreihe Dynal M-270 138
Abbildung 75 Konzentrations-Testreihe Dynal M-280 139
Abbildung 76 Konzentrations-Testreihe Dynal C1 139
Abbildung 77 Konzentrations-Testreihe Dynal T1 139
Abbildung 78 Konzentrations-Testreihe Estapor BM 2,6 140
Abbildung 79 Konzentrations-Testreihe Estapor BM 0,86 140
Abbildung 80 Konzentrations-Testreihe Estapor BM 0,3 140
Abbildung 81 Konzentrations-Testreihe Estapor BM 0,2 141
Abbildung 82 Konzentrations-Testreihe Magnamedics MagSI 0,6 141
Abbildung 83 Konzentrations-Testreihe Magnamedics MagSI 1,0 141
Abbildung 84 Konzentrations-Testreihe Seradyn MGSA 0,75 142
Abbildung 85 Konzentrations-Testreihe Seradyn dsMGSA 1,3 142
Abbildung 86 Konzentrations-Testreihe chemagen SAV1 (NCO) 0,5-1. 142
Abbildung 87 Kalibrationsreihe des CRP-Assays in PBS-Puffer mit Dynal M-270 Magnetpartikeln. 144
Abbildung 88 Kalibrationsreihe des CRP-Assays in PBS-Puffer mit Dynal M-270 Magnetpartikeln. 145
Abbildung 89 Kalibrationsreihe des CRP-Assays in PBS-Puffer mit Estapor BM 2,6 Magnetpartikeln. 146
Abbildung 90 Kalibrationsreihe des CRP-Assays in PBS-Puffer mit Seradyn dsMGSA 1,3 Magnetpartikeln. 147
Abbildung 91 Schematische Darstellung des Detektionsprinzips für *Y. pestis*. 149
Abbildung 92 Vergleich verschiedener Immobilisierungstechniken für den Extraktionsantikörper anti YP auf Polyethylen. 150
Abbildung 93 Optimierung der Extraktionsantikörperkonzentration 151
Abbildung 94 Optimierung der Detektionsantikörperkonzentration. 152
Abbildung 95 Kalibrationsreihe der Detektion von *Y. pestis* F1 154
Abbildung 96 Linearer Messbereich der Kalibrationsreihe der Detektion von *Y. pestis* F1 in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3. 155
Abbildung 97 Kalibrationsreihe der Detektion von *Y. pestis* F1 in humanem Blutserum. 157
Abbildung 98 Linearer Messbereich der Kalibrationsreihe der Detektion von *Y. pestis* F1 in humanem Blutserum. 158
Abbildung 99 Kalibrationsreihe der Detektion von *Y. pestis* F1 in Kaninchenserum mit magnetischer Extraktion. 160
Abbildung 100 Schematische Darstellung des Detektionsprinzip des *F. tularensis*-Assay. 162
Abbildung 101 Optimierung der Extraktionsantikörperkonzentration. 163
Abbildung 102 Optimierung der Detektionsantikörperkonzentration. 164
Abbildung 103 Kalibration des *F. tularensis*-Assays in Puffer 165
Abbildung 104 Kalibration des *F. tularensis*-Assays in Puffer 165
Abbildung 105 Kalibration des *F. tularensis*-Assays in Kaninchenserum. 167
Abbildung 106 Kalibration des *F. tularensis*-Assays in Kaninchenserum. 168
Abbildung 107 Kalibration des *F. tularensis*-Puffer mit magnetischer Extraktion. 170
Abbildung 108 SDS-PAGE der Aufreinigung des TSP-His Proteins. 173
Abbildung 109 Schematische Darstellung des homologen Sandwich-Prinzips mit TSP. 175
Abbildung 110 SPR-Sensogramm des homologen Sandwiches mit TSP. 175
Abbildung 111 Schematische Darstellung des heterologen Sandwich-Prinzips. 176

Abbildung 112 SPR-Sensogramm des heterologen Sandwiches 177
Abbildung 113 Schematische Darstellung des homologen Sandwich-Prinzips mit anti-ST Antikörper. 178
Abbildung 114 SPR-Sensogramm des homologen Sandwiches mit anti-ST Antikörper. 178
Abbildung 115 Modelllierung einer homologen Sandwich-Anordnung mit TSP..... 179
Abbildung 116 Modellierung des *S. typhimurium* LPS nach Bindung an das TSP-Molekül. 180
Abbildung 117 Schematische Darstellung des Messprinzips im Sandwich-Verfahren. 182
Abbildung 118 Optimierung der Extraktionsantikörperkonzentration..... 183
Abbildung 119 Optimierung der Detektionsantikörperkonzentration. 184
Abbildung 120 Kalibrationsreihe zur Detektion von *S. typhimurium* LPS in Puffer. 185
Abbildung 121 Linearer Kalibrationsbereich zur Detektion von *S. typhimurium* LPS in Puffer. 185
Abbildung 122 Kalibrationsreihe der Detektion von *S. typhimurium* LPS in CCWW. 187
Abbildung 123 Linearer Messbereich der Detektion von *S. typhimurium* LPS in CCWW. 188
Abbildung 124 Kalibrationsreihe der Detektion von *S. typhimurium* LPS in CCWW mit magnetischer Extraktion. 189
Abbildung 125 Kalibrationsreihe der Detektion von *S. typhimurium* LPS in SWW. 190
Abbildung 126 Kalibrationsreihe der Detektion von *S. typhimurium* LPS in Milch. 191
Abbildung 127 Kalibrationsreihe der Detektion von *S. typhimurium* LPS in Eigelb mit magnetischer Extraktion. 192
Abbildung 128 Schematische Darstellung der direkten Detektion von *S. typhimurium* mit Antikörper. 194
Abbildung 129 Optimale Konzentration des anti-STB Detektionsantikörpers nach Kopplung an die Magnetic Beads. 195
Abbildung 130 Kalibrationsreihe der direkten Detektion mit Antikörpern. 196
Abbildung 131 Linearer Messbereich der direkten Detektion mit Antikörpern bei pH 9,5. 196
Abbildung 132 Optimale Konzentration des anti-STB Detektionsantikörpers nach Kopplung an die Magnetic Beads. (n=2)..... 198
Abbildung 133 Kalibrationsreihe der direkten Detektion mit Antikörpern bei pH 5,0.. 199
Abbildung 134 Logarithmischer Messbereich der direkten Detektion mit Antikörpern bei pH 5,0. 199
Abbildung 135 Schematische Darstellung der direkten Detektion von *S. typhimurium* mit Antikörper..... 201
Abbildung 136 Optimale Konzentration des TSP_B Detektionsmoleküls nach Kopplung an die Magnetic Beads. 202
Abbildung 137 Kalibrationsreihe der direkten Detektion mit TSP. 203
Abbildung 138 Linearer Messbereich der Kalibrationsreihe der direkten Detektion 203
Abbildung 139 Optimale Konzentration des TSP_B Detektionsmoleküls nach Kopplung an die Magnetic Beads. 205
Abbildung 140 Kalibrationsreihe der direkten Detektion mit TSP bei pH 5,0. 206
Abbildung 141 Logarithmischer Messbereich der Kalibrationsreihe der direkten Detektion mit TSP bei pH 5,0. 206
Abbildung 142 Schematische Darstellung des kompetitiven Detektionsprinzips mit Magnetic Beads und Antikörper..... 208
Abbildung 143 Variation der pH-Werte zur Immobilisierung des *S. typhimurium* LPS an der Oberfläche des PE-Sinterkörpers. 209

Abbildung 144 Variation der Konzentration des Detektionsantikörpers anti-ST_B..... 210
Abbildung 145 Kalibrationsreihe der kompetitiven Detektion von *S. typhimurium* LPS mit Magnetic Beads in Puffer. 211
Abbildung 146 Linearer Messbereich der Kalibrationsreihe der kompetitiven Detektion von *S. typhimurium* LPS mit Magnetic Beads in Puffer. 212
Abbildung 147 Kalibrationsreihe der kompetitiven Detektion von *S. typhimurium* LPS mit Magnetic Beads in CCWW.. 213
Abbildung 148 Linearer Messbereich der Kalibrationsreihe der kompetitiven Detektion von *S. typhimurium* LPS mit Magnetic Beads in CCWW..... 214
Abbildung 149 Kalibrationsreihe der kompetitiven Detektion mit magnetischer Extraktion von *S. typhimurium* LPS mit Magnetic Beads in CCWW... 215
Abbildung 150 Linearer Messbereich der Kalibrationsreihe der kompetitiven Detektion mit magnetischer Extraktion von *S. typhimurium* LPS mit Magnetic Beads in CCWW. 216
Abbildung 151 Schematische Darstellung der Testung der Detektionsmoleküle. 217
Abbildung 152 Testung der Affinität zwischen Detektionsmolekülen und Botox B-Präparation..... 218
Abbildung 153 Schematische Darstellung der Detektion von Botox B 219
Abbildung 154 Detektion von Botox B im Sandwich-Verfahren mit monoklonalen Antikörpern..... 219
Abbildung 155 Detektion von Botox B im Sandwich-Verfahren mit monoklonalen Antikörpern und Streptavidin. 220
Abbildung 156 Kontrolle der Detektion im Sandwich-Verfahren mit monoklonalen Antikörpern und Streptavidin. 221
Abbildung 157 Schematische Darstellung der Detektion von Botox B im Sandwich-Verfahren mit Magnetic Beads. 222
Abbildung 158 Optimale Konzentration des Extraktionsantikörpers ACBB27. 223
Abbildung 159 Optimale Konzentration des biotinylierten Detektionsantikörpers ACBB18. 223
Abbildung 160 Versuch einer Kalibrationsreihe zur Detektion von *Clostridum botulinum* Toxoid B. 224
Abbildung 161 Vergleich der PE-Sinterkörper bei einer fluidischen Messung. 226
Abbildung 162 Vergleich der Messwerte bei unterschiedlichem Pufferfluss. 226
Abbildung 163 Vergleich der Messwerte mit und ohne Vorinkubation. 227
Abbildung 164 Vergleich der Messwerte bei unterschiedichem antiCRP C2-Konzentrationen. 228
Abbildung 165 Vergleich der Messwerte bei unterschiedichem antiCRP $C6_B$-Konzentrationen. 229
Abbildung 166 Vergleich der Signalkurven bei unterschiedlichem CRP-Konzentrationen. 230
Abbildung 167 Kalibrationsgerade des fluidischen CRP-Assays in PBS-Puffer. 231
Abbildung 168 Linearer Messbereich des fluidischen CRP-Assays in PBS-Puffer 231
Abbildung 169 Kalibrationsgerade des fluidischen CRP-Assays mit magnetischer Extraktion aus Kaninchenserum. 233
Abbildung 170 Linearer Messbereich des fluidischen CRP-Assays mit magnetischer Extraktion aus Kaninchenserum. 234
Abbildung 171 Schematische Darstellung eines Antikörpers. 237
Abbildung 172 Schematische Darstellung der Ausrichtung nach Immobilisierung. 238
Abbildung 173 Schematische Darstellung von Polystyrol. 242

Abbildung 174 Schematische Darstellung verschiedener Antikörper-Ausrichtungen auf Polystyrol. 243
Abbildung 175 Schematische Darstellung verschiedener Immobilisierungspositionen von biotinylierten Antikörpern an Magnetic Beads. 252
Abbildung 176 Graphische Darstellung der Signalsteigerung einer Einzelprobe. 260
Abbildung 177 Magnetisierung von Magnetic Beads 261
Abbildung 178 Schematische Darstellung der Verteilung von Magnetit-Kristallen in einem PVA-Partikel. 262
Abbildung 179 Kalibrationsreihe der magnetischen Extraktion von CRP mit Senova-Beads. 263
Abbildung 180 Graphische Darstellung der Signalsteigerung einer Einzelprobe mit Senova-Beads. 264
Abbildung 181 Schematische Darstellung der Kreuzspezifität zwischen den verwendeten Antikörpern. 288
Abbildung 182 SDS-PAGE der Botox B-Präparation. 289

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterial und Software 51
Tabelle 2 Chemikalien und Reaktionskits 52
Tabelle 3 Magnetic Beads 52
Tabelle 4 Antikörper und Antigene 53
Tabelle 5 Reaktionspuffer 54
Tabelle 6 Lösungen für die Herstellung kompetenter Zellen 54
Tabelle 7 Lösungen zum Färben und Fixieren von Polyacrylamid-Gelen 55
Tabelle 8 Puffer für FPLC-Anwendungen 55
Tabelle 9 Lysepuffer 55
Tabelle 10 Kulturmedien 56
Tabelle 11 Antibiotika und IPTG 56
Tabelle 12 Verwendete Plasmide 57
Tabelle 13 Verwendete Organismen 58
Tabelle 14 Zusammensetzung des Sammelgels 79
Tabelle 15 Zusammensetzung des Trenngels 79
Tabelle 16 Adsorptive Beschichtung auf Polystyrol 102
Tabelle 17 Kovalente Beschichtung auf Polystyrol 103
Tabelle 18 Kovalente Beschichtung auf amino-plasma-funktionalisiertem Polystyrol 103
Tabelle 19 Direkte Beschichtung mit Photolinkern auf Polystyrol 104
Tabelle 20 Größenbestimmung der Magnetic Beads 116
Tabelle 21 Bestimmung der Standardabweichung des CRP-Detektionssystems 128
Tabelle 22 Vergleich der getesteten Magnetpartikel 143
Tabelle 23 Bestimmung der Standardabweichung des CRP-Detektionssystems. 147
Tabelle 24 Intra-Assay des *Y.pestis*-Assays in Puffer. 155
Tabelle 25 Intra-Assay des *Y.pestis*-Assays in humanem Blutserum. 158
Tabelle 26 Intra-Assay des *Y.pestis*-Assays in Kaninchenserum mit magnetischer Extraktion. 161
Tabelle 27 Intra-Assay des *F. tularensis*-Assay in Puffer. 166
Tabelle 28 Intra-Assay des *F. tularensis*-Assay in Kaninchenserum. 169

Tabelle 29 Intra-Assay des *F. tularensis*-Assay mit magnetischer Extraktion in Puffer. 171
Tabelle 30 Intra-Assay des *S. typhimurium*-Assays im Sandwich-Prinzip in Puffer. . 186
Tabelle 31 Intra-Assay des *S. typhimurium*-Assays im Sandwich-Prinzip in CCWW 188
Tabelle 32 Intra-Assay des *S. typhimurium*-Assays in direkter Detektion mit Antikörpern. 197
Tabelle 33 Intra-Assay des *S. typhimurium*-Assays in direkter Detektion (pH 5,0) mit Antikörpern. 200
Tabelle 34 Intra-Assay des *S. typhimurium*-Assays in direkter Detektion mit TSP.... 204
Tabelle 35 Intra-Assay des *S. typhimurium*-Assays in direkter Detektion mit TSP bei pH 5,0. 207
Tabelle 36 Intra-Assay des kompetitiven *S. typhimurium*-Assays mit Antikörper. 212
Tabelle 37 Intra-Assay des kompetitiven *S. typhimurium*-Assays mit Antikörper in CCWW. 214
Tabelle 38 Intra-Assay des kompetitiven *S. typhimurium*-Assays mit magnetischer Extraktion in CCWW. 216
Tabelle 39 Bestimmung der Standardabweichung des CRP-Detektionssystems. 232
Tabelle 40 Bestimmung der Standardabweichung des CRP-Detektionssystems mit magnetischer Extraktion in Kaninchenserum. 235

1 Einleitung

1.1 Biosensoren

Der Begriff Biosensor erlaubt verschiedene Assoziationen. Die Kombination der Wörter „Bio-„ und „Sensor“ legt zwar einen biologischen Sensoraufbau nahe, tatsächlich ist die Abgrenzung der Biosensoren von anderen analytischen Detektionsmethoden aber deutlich enger. Bei den Biosensoren handelt es sich in der Regel um einen chemischen Sensoraufbau, der um eine biologische Detektionskomponente erweitert wird. An chemischen Sensortypen kommen z. B. amperometrische und voltammetrische Elektroden, Feldeffekttransistoren, Sauerstoff- und andere Gassensoren, Schwingquarze sowie optische Systeme zum Einsatz. An optischen Systemen werden häufig Indikatorsensoren, Oberflächenplasmonresonanz und Fluoreszenzdetektoren verwendet. Typische biologische Komponenten sind Antikörper, Enzyme, prokaryontische und eukaryontische Zellen sowie andere biotechnologisch hergestellte, nicht-natürlich vorkommende Detektionselemente (KEUSGEN, 2002).

Als allgemein anerkannte Erläuterung für Biosensoren bezeichnet man hier ein System, bei dem eine biologische Komponente mit einem Signalwandler (Transducer) kombiniert oder zumindest räumlich verknüpft wird (TURNER ET AL., 1987). Die Definition der IUPAC für Biosensoren verlangt zusätzlich die Eigenschaften der Regenerierbarkeit und der Befähigung zur kontinuierlichen Messung (THEVENOT ET AL., 1999).

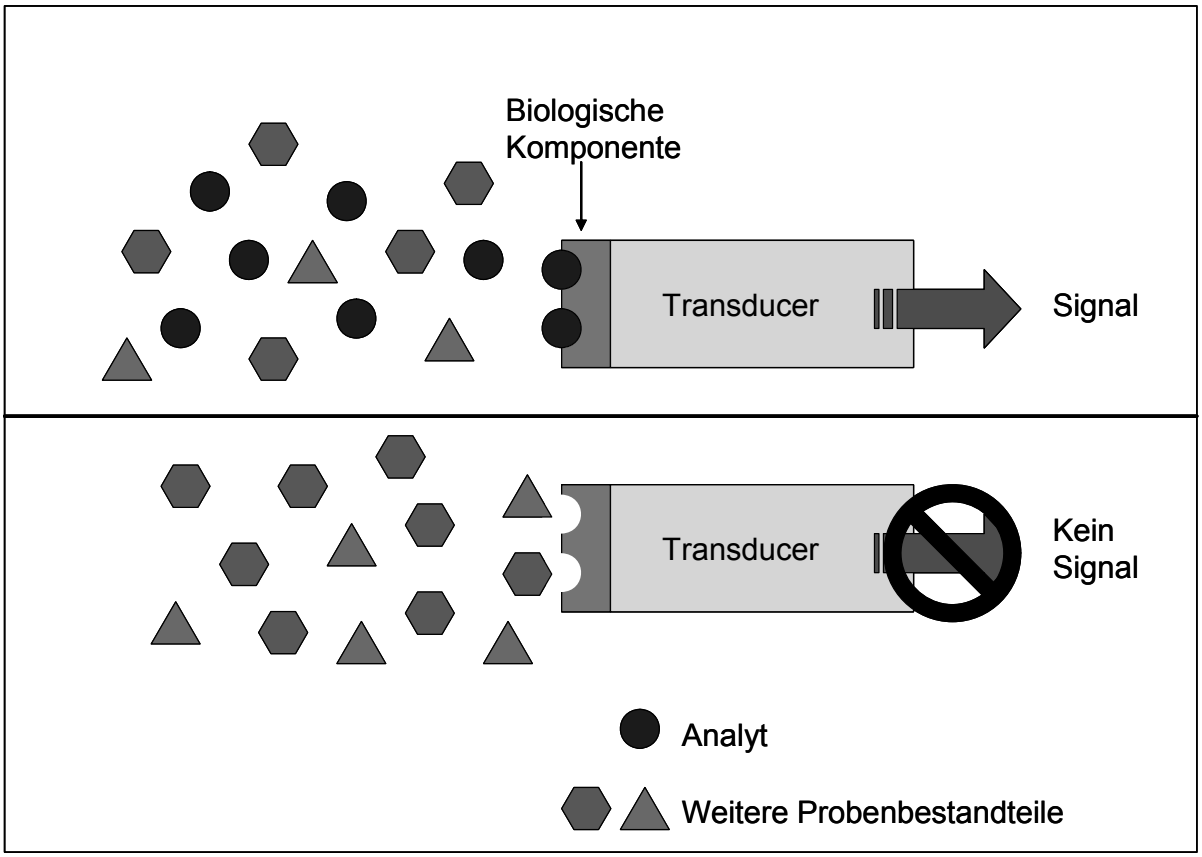


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Biosensors, nach KEUSGEN (2002).

Die Biosensor-Definition der IUPAC basiert u. a. auf den charakteristischen Eigenschaften des ersten beschriebenen Biosensors von CLARK UND LYONS (1962), aufbauend auf der Clark-Elektrode. Die Clark-Elektrode, nach Prof. Leland C. CLARK Jr. (1956) benannt, ist ein heute noch eingesetzter amperometrischer Sensor zur Detektion von Sauerstoff in wässrigen Lösungen. Durch Kombination dieses chemischen Sensors mit dem Enzym Glucoseoxidase als biologischer Komponente war der erste Biosensor zur Bestimmung von Glucose in wässrigen Lösungen etabliert. Die Glucoseoxidase wurde hierfür an einer über die Elektrode gespannten Membran immobilisiert. Der Glucosegehalt einer Lösung konnte somit über den Sauerstoffverbrauch der enzymatischen Glucoseoxidation bestimmt werden. Trotz Problemen mit Herstellung und Stabilität erregte dieser erste Biosensor hohes wissenschaftliches und wirtschaftliches Interesse.

Die Entwicklung einer potentiometrischen Enzym-Elektrode gelang GUILBAULT UND MONTALVO (1969) mit dem Enzym Urease zur Detektion von Harnstoff. Die technische Entwicklung ermöglichte in den 70'ern erstmals feinauflösende thermische Messungen in so genannten Thermistoren (MOSBACH UND DANIELSSON, 1974), die die thermische Freisetzung einer Enzymreaktion detektieren konnten. Fast zeitgleich wurden optische

Systeme entwickelt, die ein Produkt der immobilisierten Enzyme nach Reaktion mit dem Analyten detektieren konnten. Insbesondere faseroptische Systeme, die so genannten Optoden, wurden als sensitive Messsysteme bekannt (VOELKL ET AL., 1980). Parallel zur technologischen Entwicklung wurde auch die biologische Komponente komplexer. Der Einsatz von Mediatoren zwischen Enzym und Elektrodenoberfläche, die Nutzung von Rückreaktionen zur Signalamplifikation und der Einsatz ganzer Enzymkaskaden machte den Einsatz von Biosensoren sensitiver und erschloss bisher nicht-detektierbare Analyte (KEUSGEN, 2002).

Die Zukunft der biosensorischen Entwicklung liegt in der Miniaturisierung. Zuerst wurden so genannte Handheld-Geräte entwickelt; typische Beispiele sind die kommerziell erhältlichen Blutzucker (Glucose)-Sensoren oder Laktatsensoren. Der Glucosesensor ist immer noch der kommerziell erfolgreichste Biosensor-Typ.

Ein Ansatz zur Miniaturisierung von Elektroden, z. B. von subkutanen Glucosesensoren (SHICHIRI ET AL., 1982) war zwar erfolgreich, wurde aber nicht kommerzialisiert. Ein Grund hierfür kann auch der zunehmende Einsatz von Feldeffekttransistoren anstelle von Elektroden sein (MARQUETTE UND BLUM, 2006).

Der Fokus der Wissenschaft liegt zurzeit auf noch höher integrierten Systemen, hier sind z. B. Biochips bzw. Lab-on-a-Chip-Systeme zu nennen, die mit Messpunkten auf Wafern (DUPUY ET AL., 2005) oder mikrofluidisch mit mehreren Komponenten wie z. B. Detektor, Mixer, elektrophoretischer Trennung und anderen Elementen (CRAIGHEAD, 2006 und GOLDBACH ET AL., 2006) aufgebaut sein können.

Die in dieser Arbeit behandelte magnetische Detektion wird erst in den letzten Jahren beschrieben; vorher wurden Magnetpartikel nur als Trägermoleküle und Extraktionshilfe verwendet, als Form der maximal möglichen Integrierung mittlerweile auch in Lab-on-a-Chip-Systemen (PAMME 2006, BRUCKL ET AL., 2005).

Allgemein wurde die Möglichkeit, Magnetpartikel auch als Markierungsmoleküle zu nutzen, lange Zeit vernachlässigt. Erst in den letzten Jahren wurde diese Eigenschaft erkannt und in Form verschiedenster Techniken eingesetzt (BRZESKA ET AL., 2004).

Der IUPAC-Definition für Biosensoren unterliegen nicht alle etablierten Biosensoren. Insbesondere die Wiederverwendung der Messanordnung ist aus Hygiene- und Produktionsgründen nicht immer sinnvoll. Daher sind z. B. auch die Blutzucker-Messgeräte keine Biosensoren gemäß IUPAC. Hier wird häufig die allgemein anerkannte Definition von Turner bevorzugt. Der in dieser Arbeit verwendete Biomagnetsensor erfüllt

die engere Definition eines Biosensors aus mehreren Gründen nicht vollständig. Zum einen ist die biologische Komponente, das heißt die Erkennungsmoleküle; nicht an den technischen Sensor gekoppelt; es handelt sich nur um eine magnetische Ausleseeinheit. Zusätzlich werden die Messsäulen nur jeweils einmal verwendet. Eine Regeneration ist aber denkbar. Dagegen erfüllt der aufgebaute SPR-Sensor zur Detektion des C-reaktiven Proteins (CRP) und Salmonellen-Lipopolysaccharid die Anforderungen eines Biosensors nach IUPAC.

1.2 Detektion mit spezifischen Biomolekülen

An die biologische Komponente eines Biosensors werden besondere Anforderungen bezüglich Spezifität, Stabilität und Standzeit gestellt. Spezifität bedeutet, dass die biologische Komponente einen Analyten definitiv und ohne Kreuzreaktionen aus einer Probenlösung mit verschiedenen Komponenten detektiert wird. Stabilität und Standzeit beziehen sich auf die Robustheit der biologischen Komponente bzw. ihrer Einsatzfähigkeit in verschiedenen Probenmatrices, auch über längere Lagerungszeiträume.
Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten biologischen Komponenten waren hauptsächlich Antikörper und rekombinante Phagenproteine (vgl. Kap. 1.5). Die verwendeten Antikörper richteten sich hauptsächlich gegen Proteine (z. B. CRP, *Yersinia pestis* Kapselprotein). Zusätzlich wurden Antikörper und auch Phagenproteine gegen Lipopolysaccharide (z. B. Salmonellen und *Francisella tularensis*) eingesetzt. Als Lipopolysaccharid (LPS) bezeichnet man Oberflächenstrukturen bei Bakterien, die aus einem Lipidanker zur Stabilisierung in der Zellmembran, einem Protein-Linker und einem nach außen gerichtetem Polysaccharid bestehen. Oftmals ist das Lipopolysaccharid auch ein typisches Bakterien-Antigen (z. B. ist LPS das O-Antigen der Salmonellen) und somit für das jeweilige Bakterium charakteristisch aufgebaut.

Um Antikörper und andere Proteine als biologische Komponente in einer biosensorischen Anwendung einsetzen zu können, bedarf es einer Kopplung oder zumindest räumlichen Nähe des Moleküls zum Sensor. Die Gewährleistung einer solchen zielgegebundenen Anwesenheit eines solchen Moleküls z. B. auf der Sensoroberfläche kann nur durch Einsatz verschiedener Immobilisierungstechniken erreicht werden.

1.3 Immobilisierung von Biomolekülen

Die Immobilisierung der biologischen Komponente eines Biosensors und die dadurch ermöglichte Wiederverwendbarkeit und Stabilität ist von zentraler Bedeutung bei der Entwicklung eines Biosensors. Im Reaktionsmedium lösliche Enzyme und Organismen erfüllen zwar auch den Zweck der biologischen Signalgebung; ein technischer Einsatz ist aber aus ökonomischen und analytischen Gründen nicht sinnvoll. Bei der Immobilisierung von biologischem Material können verschiedene Grundtechniken angewandt werden. So gibt es die adsorptive, die ionische und die kovalente Bindung, die Quervernetzung, die Matrixeinhüllungs- und die Membran-Abtrennungsmethode (HARTMEIER, 1986). Zusätzlich gibt es natürliche Bindungssysteme, wie z. B. die Biotin-Strepatavidin-Kopplung oder die Zucker-Lektin-Bindung (SALEEMUDDIN UND HUSAIN, 1991)

Die Vorteile der adsorptiven Bindung liegen in ihrer einfachen Durchführbarkeit und einer guten Reproduzierbarkeit der Selbstorganisation der Biomoleküle auf der beschichteten Oberfläche. Außerdem ist eine Vielzahl von Oberflächen ohne weitere Modifizierung für eine adsorptive Beschichtung zugänglich. Nachteilig wirkt sich die ungerichtete Bindung der Biomoleküle an die Oberfläche aus; hierdurch werden z. B. Antikörper in ihrer Bindungsfähigkeit eingeschränkt (BUTLER ET AL., 1992). Zusätzlich hängt die Stabilität der Bindung stark vom pH, der Ionenstärke und der Scherkraft innerhalb der Messanordnung ab.
Der Einsatz ionischer Immobilisierungen erfolgt heutzutage zumeist mit Metallkomplexen, wie z. B. der Nickel-Nitrilotriessig-Chelator (Ni-NTA), wobei das zu immobilisierende Biomolekül mit einem 6-fachen Histidin-Motiv (6-His-Tag) ausgestattet sein sollte (HAINFELD UND POWELL, 2000). Diese Form der Immobilisierung ist ebenfalls relativ anfällig für Änderungen des pH und der Ionenstärke; auch andere Komplexbildner wie z. B. EDTA lösen die Immobilisierung wieder auf.

Durch den deutlich stärkeren Bindungstyp der kovalenten Bindung sowie der Quervernetzung wird diese Technik relativ häufig bei Biosensoren eingesetzt (SHRIVER-LAKE ET AL., 1997). Vorteile sind die stabile und planmäßig gerichtete Bindung des Biomoleküls. Nachteile dieser Immobilisierungsmethoden liegen neben der oft komplexen Bindungschemie auch in der Konformationsänderung vieler Enzyme bei Knüpfung kovalenter Bindungen und den in diesem Zusammenhang häufig zu beobachtenden

Aktivitätsverlusten der immobilisierten Enzyme gegenüber nativen Proteinkonformationen (WANG, 2005).

Die beschriebene Problematik entfällt bei einer Immobilisierung in einer Matrix. Hierbei wird das Immobilisat in natürliche (z. B. Alginat) oder künstliche Matrices, wie z. B. Polyvinylalkohol (PVA) und Sol-Gele, eingehüllt. Diese Methode ist besonders schonend; nachteilig wirkt sich aber die schlechtere sterische Zugänglichkeit aus. Außerdem können nicht für jede Anwendung Matriximmobilisierungen verwendet werden (HARTMEIER 1986).

1.4 Antikörper

Unter dem Begriff Antikörper versteht man Proteine, die in der Lage sind, spezifisch an Moleküle zu binden. Antikörper findet man in fast allen Geweben von Lebwesen mit einem strukturierten Immunsystem. Das Hauptvorkommen der in den Lymphknoten gebildeten Antikörper ist die Lymphe und das Blutplasma. Man bezeichnet diese Elemente der Immunantwort als Immunglobuline. Die Antikörper der Mammalia lassen sich anhand ihrer Größe und Struktur in verschiedene Klassen und Aufgaben einteilen. Bekannt sind die Immunglobuline A (IgA), M (IgM), G (IgG), D (IgD) und E (IgE) (DIAMANDIS UND CHRISTOPOULOS, 1996).

Immunglobulin A und M bilden die erste Abwehr gegen bakterielle und virale Infektiva, wobei IgA hauptäschlich in Sekreten (Speichel, Tränenflüssigkeit) und IgM im Serum vorkommt. IgM fungiert hier außerdem als Signalgeber für das gesamte Komplementsystem der Immunantwort.

Immunglobulin G ist der Antikörper für eine längere und nachhaltige Immunantwort und kommt im Blutserum vor. Dieser bildet oftmals auch die Gedächtniswirkung des Immunsystems, z. B. nach einer Impfung.

Während die Funktion des IgD noch nicht vollkommen aufgeklärt ist, dient das Immunglobulin E der Abwehr parasitärer Infektionen, wie z. B. Plasmodien, Trypanosomen und Würmer und spielt auch bei Allergien eine entscheidende Rolle.

Entscheidend für die Funktion und biosensorische Anwendbarkeit eines Antikörpers ist seine Struktur. Abb. 2 zeigt die schematische Darstellung eines IgG-Moleküls; hierbei

handelt es sich um das in dieser Arbeit am häufigsten verwendete Immunglobulin. Darstellung nach DIAMANDIS UND CHRISTOPOULOS (1996).

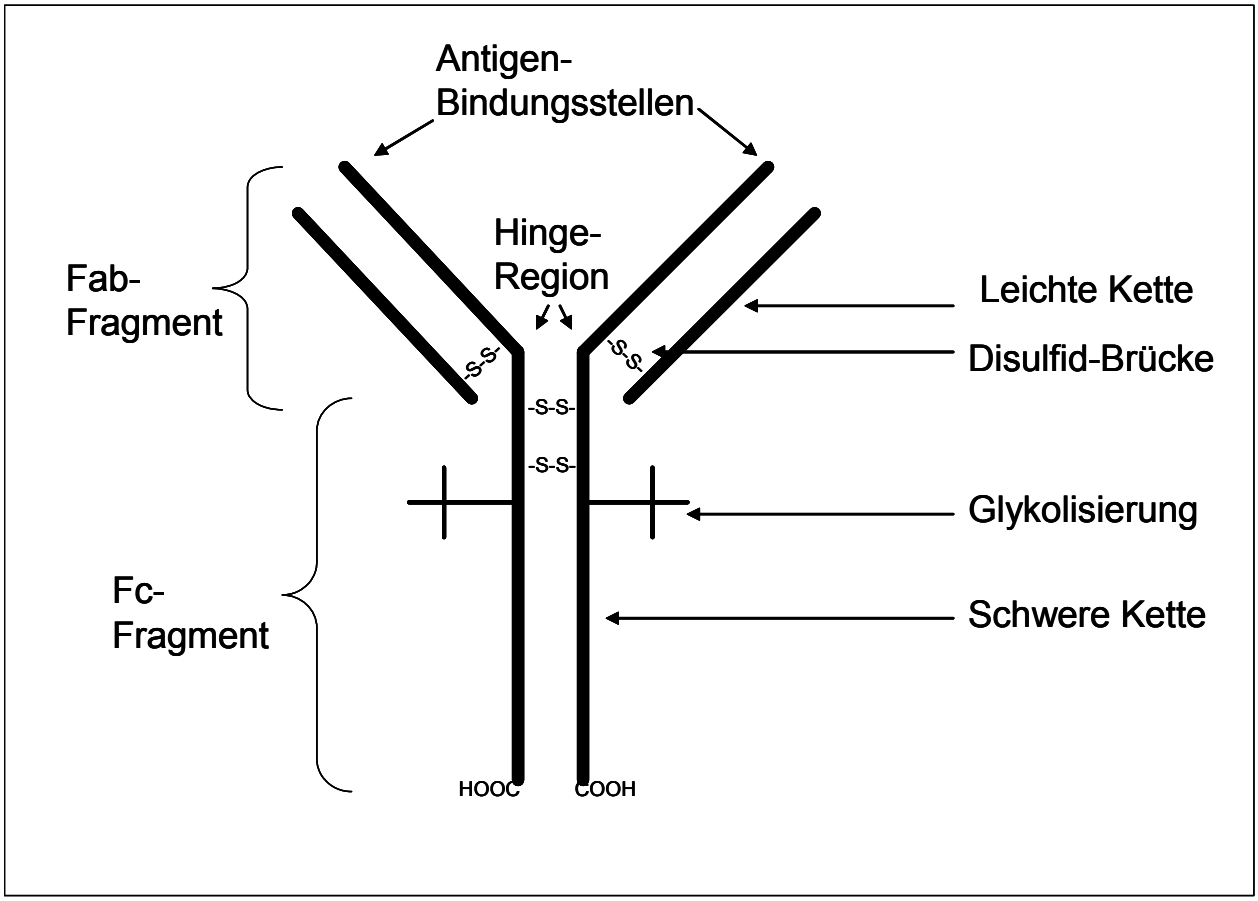


Abbildung 2 Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.

Ein typisches IgG-Molekül besteht aus 2 leichten (je ca. 25 kDa) und 2 schweren (je ca. 50 kDa) Proteinketten, die zusammen die typische Y-Struktur eines IgG-Moleküls mit einem Gewicht von ca. 150 kDa bilden. Die einzelnen Ketten sind hierbei über Disulfid-Brücken verknüpft.

Bei dem längeren Teil des Fc-Fragments handelt es sich um stark konservierte Abschnitte. Sie sind bei den meisten IgG-Molekülen ähnlich aufgebaut. Diese Bereiche werden von Sekundärantikörpern (z. B. anti-Mensch) erkannt und dienen dem strukturellen Aufbau und der Immunerkennung der Antikörper durch sekundäre Prozesse, wie z. B. Makrophagen.

Die Antigen-Bindungsstellen eines Antikörpers sind sehr variable Bereiche auf den leichten und schweren Ketten. Diese Bereiche sind für das jeweilige zu bindende Antigen unterschiedlich und an den verschiedenen Armen eines Antikörpers können

unterschiedliche Antigen-Bindungsstellen ausgeprägt sein. Dies ist bei polyklonalen Antikörpern sehr häufig der Fall.

Die Hinge-Region erfüllt ebenfalls wichtige Strukturfunktionen. Trotz der hier vorhandenen Disulfid-Brücken ist das Antikörper-Molekül an dieser Position beweglich und kann so flexibel an verschiedene Antigenpositionen binden. Die Hinge-Region ist außerdem eine Spaltungsstelle der IgG-Antikörper (JANEWAY UND TRAVERS, 1995).

Neben den sehr häufig verwendeten IgG-Molekülen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch IgM-Antikörper eingesetzt. Diese zeichnen sich durch eine sternförmige Struktur aus. Außerdem verfügen diese Moleküle neben ihrer extremen Größe auch über insgesamt 10 Antigen-Bindungsstellen.
Eine weitere Klasse von Immunglobulinen stellen die IgA-Antikörper dar. Diese werden als dimere Moleküle in Tränen und Speichel sekretiert, teilen sich aber dann in Monomere auf.

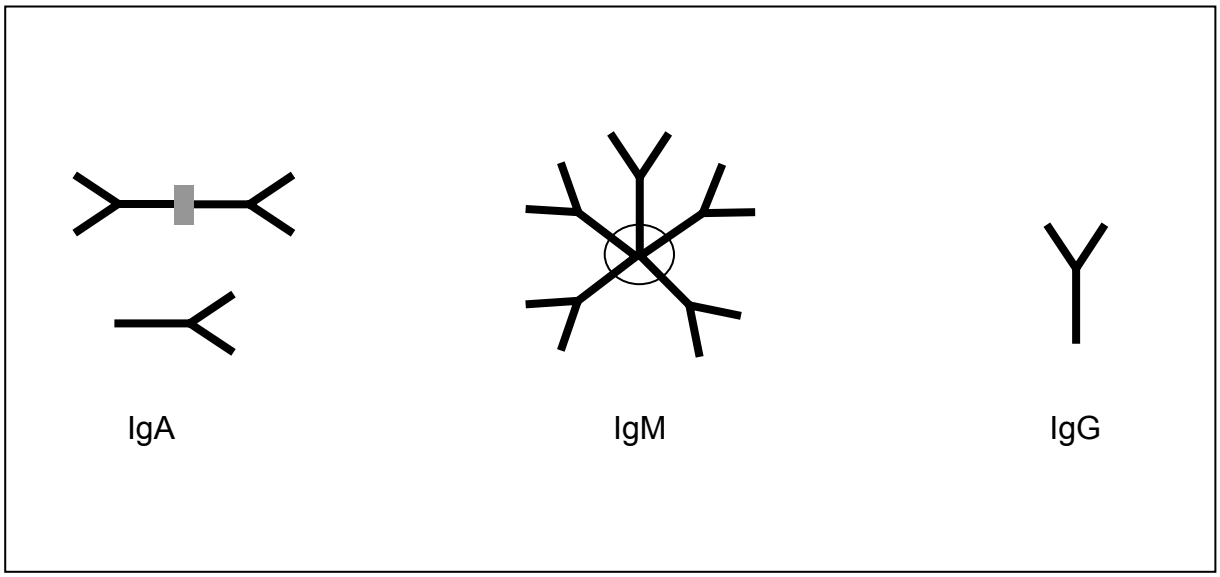


Abbildung 3 Schematische Strukturdarstellung von Immunglobulin A, M und G.
IgA wird in sekretierter Form (oben) und als aktive Form (unten) dargestellt.

Inkubiert man einen IgG-Antikörper mit der pflanzlichen Protease Papain, so erfolgt eine Spaltung des Moleküls an der Hinge-Region in verschiedene Unterfragmente (vgl. Abb. 4). Zum einen entsteht das Fc-Fragment (Fragment crystallizable), zum anderen entstehen zwei Fab-Fragmente (Fragment antigen binding), die nun jeweils eine Antigen-Bindungsstelle enthalten. Diese Fragmente können ebenfalls als Antigen-bindende Moleküle eingesetzt werden.

Bei einer Spaltung eines IgG-Moleküls mit der tierischen Protease Pepsin entsteht ein $(Fab)_2$-Fragment. Hierbei handelt es sich um die beiden verbundenen Fab-Fragmente mit der Hinge-Region. Der Rest des Fc-Fragments wird weiter degradiert. Auch dieses Molekül kann als Antigen-Bindungselement verwendet werden.

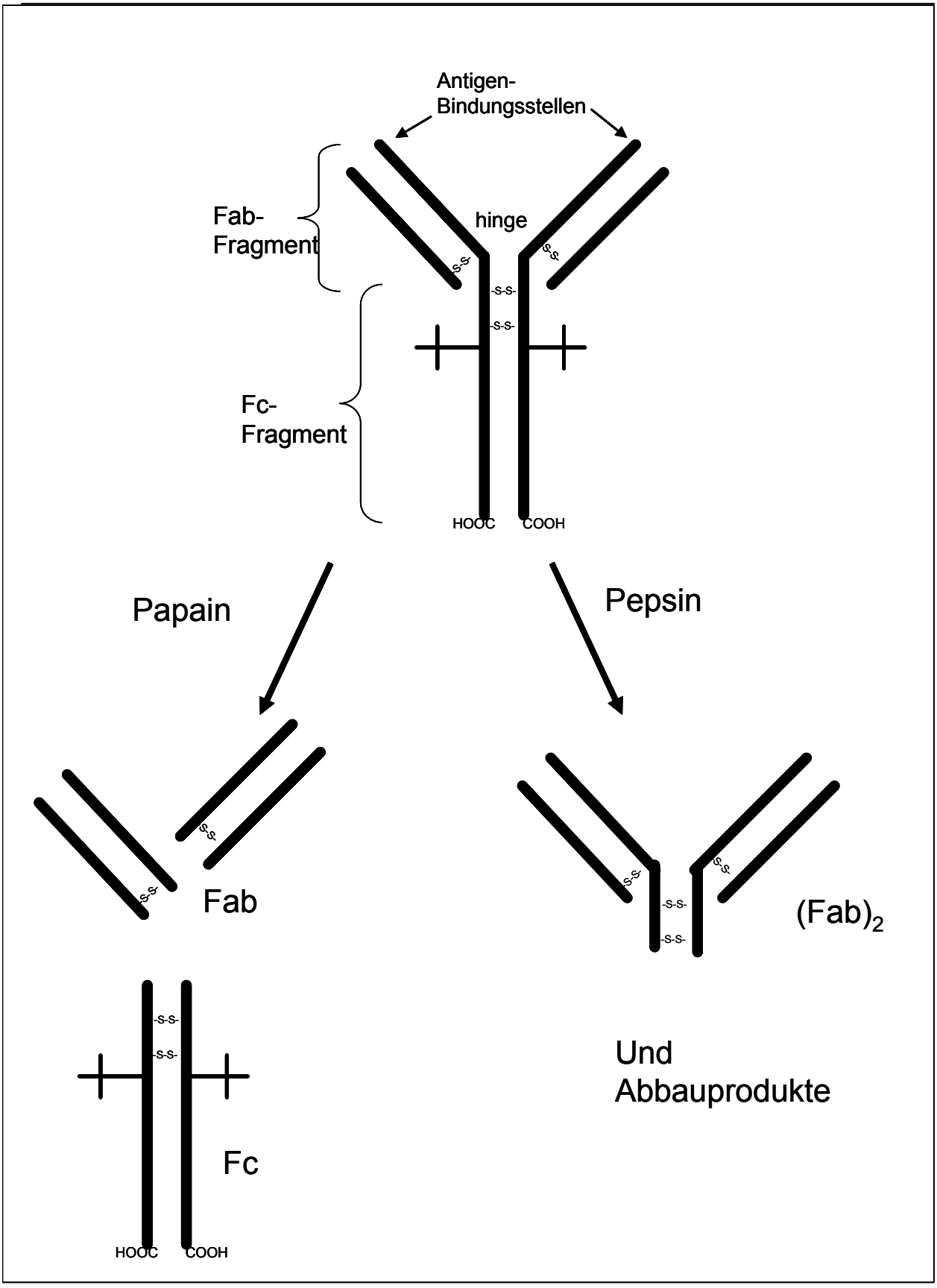


Abbildung 4 Enzymatische Spaltung eines IgG-Moleküls mit Papain und Pepsin.

Herstellung von Antikörpern

Die Herstellung von Antikörpern für wissenschaftliche und therapeutische Zwecke erfolgt heutzutage auf zwei verschiedenen Wegen. Generell wird hierbei zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern unterschieden. Monoklonale Antikörper sind erbgleich, das heißt, sie richten sich nur gegen ein Epitop und werden aus einem B-Lymphozyten-Klon hergestellt. Unterschiedliche Produktionschargen haben immer die gleiche Spezifität.
Polykonale Antikörper können dagegen unterschiedliche Spezifitäten haben. Ihre Herstellung erfolgt durch eine Immunisierung von Labortieren (z. B. Kaninchen, Ziege, Schaf, Pferd) mit dem gewünschten Zielantigen. Dieses aktiviert eine Immunantwort des tierischen Immunsystems durch Aktivierung mehrer B-Lymphozyten. Diese produzieren dann Antikörpermoleküle gegen das jeweilige Antigen. Da diese Herstellung nicht gerichtet und steuerbar ist, entstehen immer mehrere verschiedene Antikörpermoleküle mit dieser Antigenspezifität. Die Mischung der verschiedenen Antikörpermoleküle werden dann unter dem Begriff des polyklonalen Antikörpers zusammengefasst.
Die Gewinnung der Antikörper erfolgt durch Entnahme von Blut oder Lymphe des immunisierten Tieres und anschließender Fraktionierung der Immunglobuline. So kann z. B. die Fraktion der IgG-Antikörper über eine spezielle ProteinA-Säule abgetrennt werden. Da in der gesamten IgG-Fraktion des Tieres oft nur wenige Antikörper gegen das spezielle Antigen vorhanden sind, werden diese durch weitere affinitätschromatographische Schritte extrahiert und können anschließend verwendet werden (GLICK UND PASTERNAK, 1995).

Im Gegensatz hierzu erfolgt die Herstellung monoklonaler Antikörper mithilfe der Hybridoma-Technik (KÖHLER UND MILSTEIN, 1975). Hierbei wird ebenfalls ein Labortier (hier meistens Mäuse) mit dem gewünschten Antigen immunisiert. Aus der Milz des immunisierten Tieres entnimmt man anschließend die B-Lymphozyten. Da diese nur eine begrenzte Lebensdauer aufweisen, erfolgt eine Fusionierung der B-Lymphozyten mit Tumorzellen. Tumorzellen sind unbegrenzt teilbar und somit unsterblich; daher kann eine Vielzahl stabiler B-Lymphozyten-Hybridomas gewonnen werden. Aus einer solchen Präparation werden im Anschluss diejenigen Zellen isoliert, die den gewünschten Antikörper sekretieren. Durch Zellkultur dieser Linien kann der gewünschte Antikörper aus dem Zellkulturmedium gewonnen werden.

Oftmals werden mehrere antikörperproduzierende Hybridoma-Zellen aus einem Tier gewonnen; daher existieren für einen Antikörper-Typ entsprechend mehrere Klone mit teilweise unterschiedlichen Epitopen.

Die Produktionskosten eines monoklonalen Antikörpers sind aufgrund der beschriebenen Herstellungsweise deutlich höher als bei polyklonalen Antikörpern. Allerdings liegt der Vorteil der monoklonalen Antikörper in ihrer exakt bestimmbaren Spezifität und in ihrer Reproduzierbarkeit.

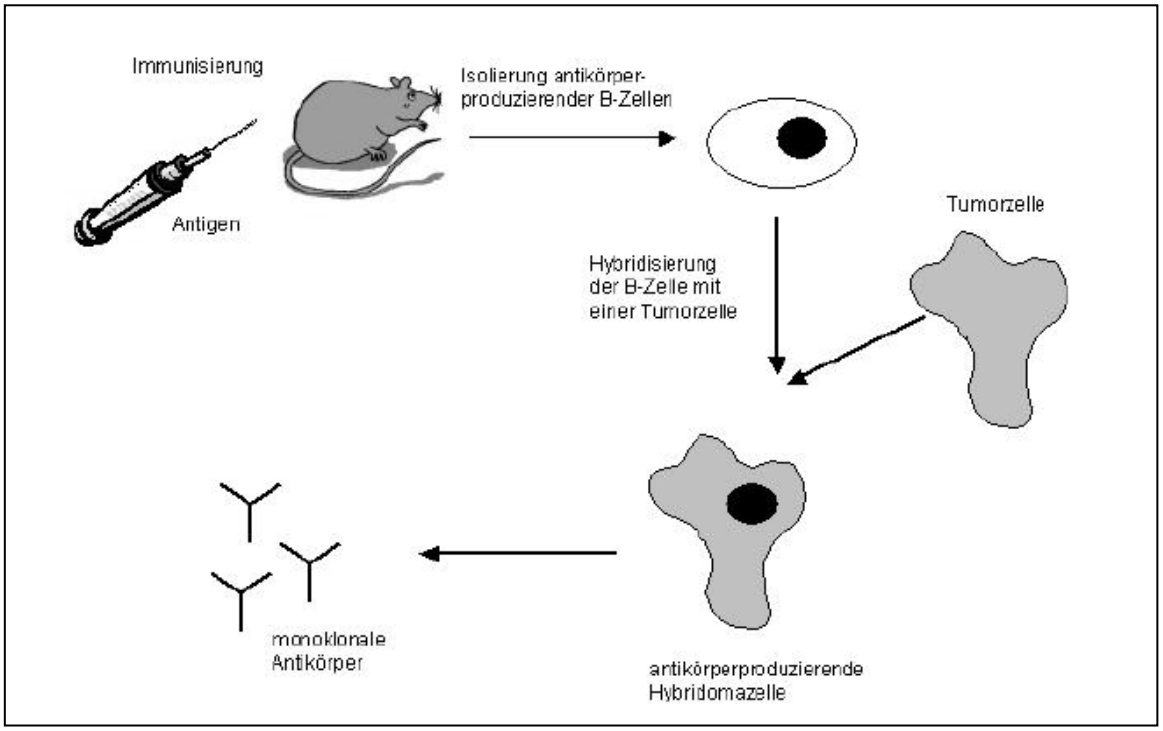


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Hybridoma-Technik.

Antigen-Antikörper-Wechselwirkung

Typische Antigene sind Proteine. Zusätzlich werden aber auch Antikörper gegen Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipide oder chemische Stoffe gebildet. Auch die Kombination verschiedener dieser Stoffe kann als Antigen fungieren. Als Basisdefinition gilt das Antigen als Substanz, die eine Immunantwort des Wirts hervorruft und mithilfe gebildeter Antikörper erkannt werden kann (WU, 2000). Die Fähigkeit zur Hervorrufung einer Immunantwort durch ein entsprechendes Antigen wird als Immunogenität bezeichnet. Kleine Moleküle besitzen oftmals keine Immunogenität und werden erst durch Kopplung mit größeren Molekülen zu Antigenen. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass die

gebildeten Antikörper gegen die gewünschte Substanz gerichtet sind; und nicht gegen das zur Vergrößerung eingesetzte Restmolekül.
Die Region eines Antigens, die von einem Antikörper erkannt wird, bezeichnet man als Epitop oder antigene Determinante. Da ein Epitop nur einen sehr kleinen Teil eines Antigens umfasst kommt es vor, dass ein anderes Antigen über ein gleiches Epitop verfügt. Dies ist dann die molekulare Basis für Kreuzreaktionen. Gleichzeitig kann ein Antigen verschiedene Epitope tragen, wodurch die unterschiedliche Spezifität verschiedener Antikörper-Klone bedingt wird.

Die Bindung des Antigens an den Antikörper erfolgt durch eine Kombination verschiedener, nichtkovalenter Wechselwirkungen. Im Einzelnen sind dies Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen (Coulomb-Wechselwirkungen), van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen. Die weitreichenden Kräfte wie ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken sind wichtig für die Bindungsrate des Antigen-Antikörper Komplexes, die weniger weit reichenden sind wichtig für die Stärke der Bindung.

Generell gilt, je mehr und spezifische Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper existieren, umso genauer und stabiler ist ein Antikörper für diagnostische Zwecke.
Je stärker die Bindung des Antigens zum Antikörper ist, umso geringer ist die Dissoziationsrate. Typische Dissoziationskonstanten liegen bei Antigen-Antikörper-Komplexen bei 10^{-7} bis 10^{-9} M.

1.5 Phagenproteine als Detektionsmoleküle

Phagen bzw. Bakteriophagen bezeichnet eine spezielle Gruppe von Viren. Der Begriff Phage leitet sich von *phagein* (griechisch = fressen) ab und beschreibt den lytischen Effekt eines Phagenpartikels auf seinen Wirt. Die erste Beschreibung von Phagen erfolgte 1917 durch Félix Hubert d'Hérelle in einem Aufsatz mit dem Titel „*Über eine unsichtbare, der Dysenterie-Bacillus entgegenwirkende Mikrobe*“. Er beschrieb die Wirkung eines Shigellen-Phagen auf eine *Shigella*-Kultur.

Der vielleicht bekannteste Vertreter dieser Viren-Klasse ist der λ-Phage; dieser befällt *Escherichia coli*-Kulturen und ist ein etabliertes Beispiel in der Genetik.

Phagen sind sehr wirtsspezifisch und befallen nur Bakterien und Archea. Hierbei unterteilt man die Phagen nach ihrer Wirtspezifität, z. B. Shigellen-Phagen, Salmonellen-Phagen, und coliforme Phagen.
Die teilweise extreme Wirtsspezifität der Phagen ermöglicht ihren Einsatz als Detektions- und Unterscheidungselement. So wird z. B. die Lysotopie (auch phage typing genannt) mittlerweile als routinemäßige Diagnosetechnik eingesetzt (PETTY et al., 2007).
Zusätzlich wird ein Einsatz von Phagen zur Abtötung von Bakterien diskutiert. Während solche Bemühungen z. B. in der Abwasserbehandlung schon recht weit fortgeschritten sind, ist ein breiter Einsatz von Phagen als Antibiotika-Ersatz zurzeit noch unwahrscheinlich (KHARDORI, 2006).
Neben einer Anwendung von Phagen als gentechnische Vektoren in der Biotechnologie und Agrartechnik brachten neue Entwicklungen der Biotechnologie das so genannte phage display hervor. Hierbei handelt es sich um eine Methode, um mögliche Antikörper-Liganden auf der Hülle des Phagen zu präsentieren und somit schnelle Screenings auf spezielle Zieltargets zu ermöglichen (PETTY et al., 2007).

Phagen zeigen eine Bandbreite unterschiedlicher Strukturen. Als Basismerkmal gibt es aber immer einen Phagenkopf mit enthaltener DNA oder RNA. Zusätzliches Merkmal ist ein Adhesionsbereich, mit dem der Phage seine Wirtszelle erkennt und diese penetriert. Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung des Phagen T2. Hierbei handelt es sich um einen komplexen *E. coli*-Phagen.

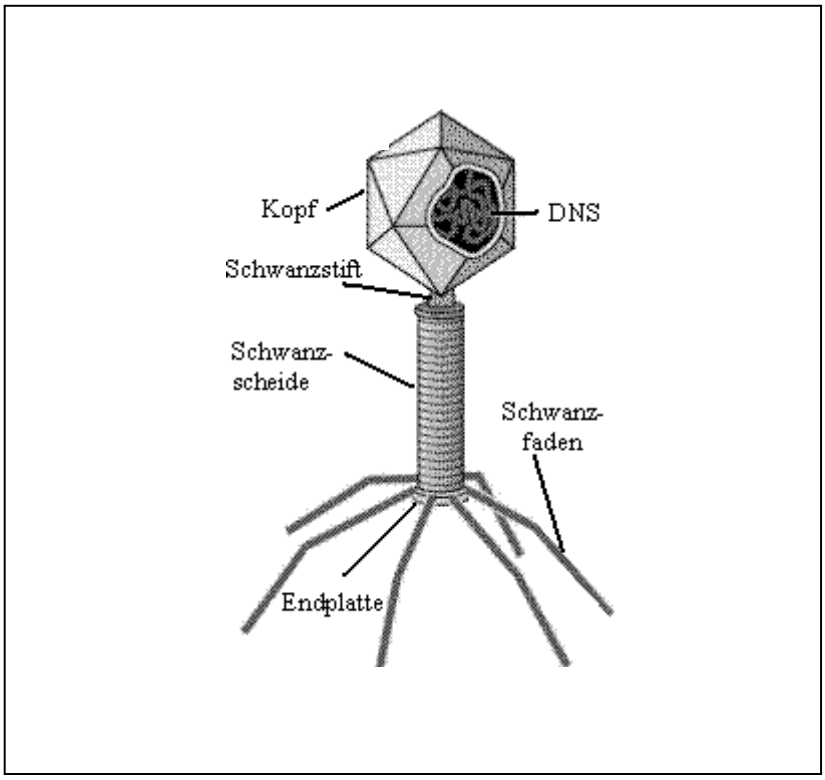


Abbildung 6 Schematische Darstellung des Phagen T2.

Bei der Penetration eines Wirtes durch einen Phagenmolekül (z. B. Phage T2) kommt es zuerst zu einer Erkennung der Wirtszelle mithilfe der Schwanzfäden. Durch Anlagerung der Endplatte und an ihr befindlicher Penetrationsstacheln (spikes) kommt es zu einer festen Verbindung zwischen Phage und Wirt. Durch Kontraktion der Schwanzscheide injiziert dieser nun sein Erbmaterial in die Wirtszelle. Die übergebene DNA enthält den kompletten genetischen Bauplan des Phagen und zusätzlich noch Gene für eventuell benötigte Konstruktions- und Lyseenzyme. Nach Replikation, Transkription und Translation der Phagen-DNA durch die biochemischen Instrumente der Wirtszelle entstehen mehrere Klone des ursprünglichen Phagenpartikels. Bei deren Austritt aus der Wirtszelle wird diese zerstört.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Phagen P22 handelt es sich um einen *Salmonella typhimurium*-spezifischen Phagen (ISRAEL et al., 1976). Die Struktur dieses Phagenpartikels ist einfacher als der beispielhaft beschriebene Phage T2, aber analoge Grundstrukturen können abgeleitet werden (vgl. Abbildung 7).

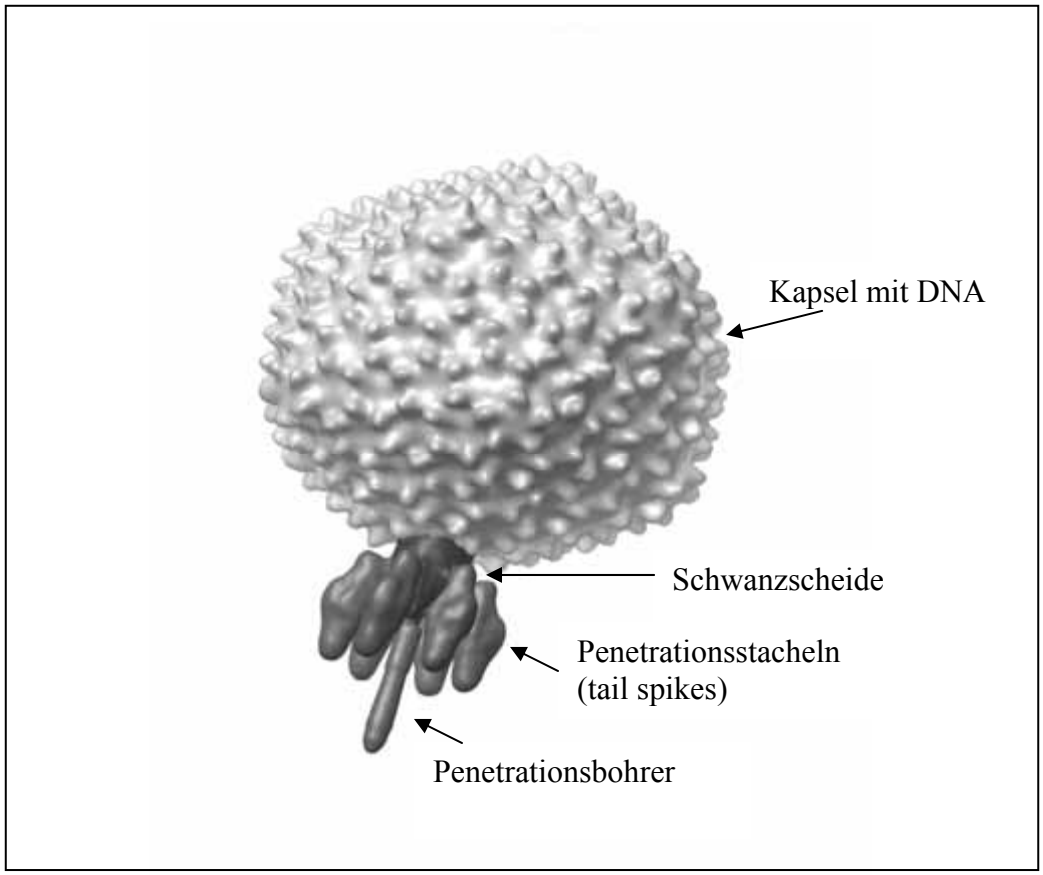


Abbildung 7 Schematische Darstellung des Phagen P22. (Bildquelle: http://www.carbon.bio.ku.edu)

Als Erkennungselemente zur Detektion und Bindung an *S. typhimurium* wurden bei diesem Phagen die Penetrationsstacheln, die sogenannten tail spikes identifiziert. Jedes Phagenmolekül enthält 6 dieser Proteine, deren strukturelle Aufklärung 1996 STEINBACHER ET AL. gelang (Abbildung 8). Die PDB-Kennung lautet 1TYX.

Jedes tail spike protein (TSP) kann an ein O-Antigen von *S. typhimurium* der gängigen Serotyps A und B binden. Die weiteren, selten vorkommenden Serotypen C, D und E unterscheiden sich von A und B im O-Antigen und werden nicht erkannt. Bei dem *S. typhimurium* O-Antigen handelt es sich um ein zellwandgebundendes Lipopolysaccharid (LPS). Das native TSP verfügt zusätzlich noch über eine Endorhamnosidase-Aktivität. Diese bewirkt eine Spaltung des Lipopolysaccharids nach erfolgter Phagenbindung, sodass das LPS von weiteren Phagenpartikeln nicht erkannt werden kann (BAXA ET AL., 1996).

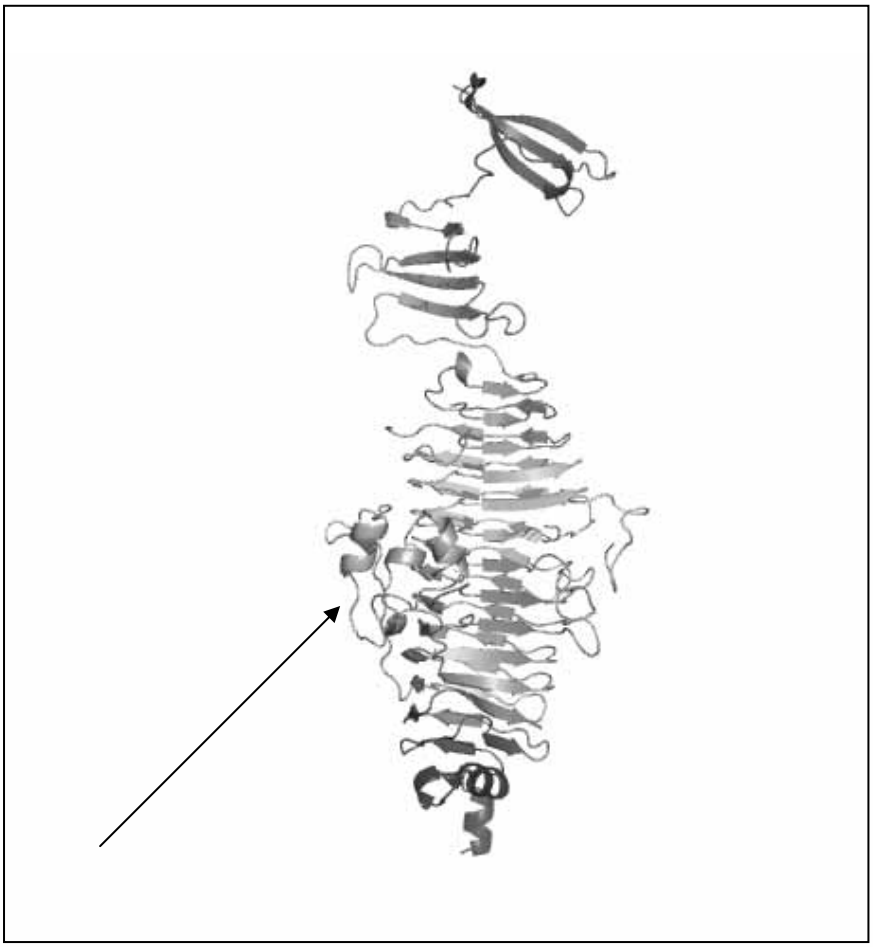


Abbildung 8 Strukturelle Darstellung des P22 tail spike Protein (1TYX). Pfeil = LPS-Bindedomäne.

Zur Verwendung eines Phagenproteins als biosensorische Detektionskomponente wurde von Wolfgang Klein im Rahmen des InnoNet-Projektes „HighGen“ eine verkürzte Form des P22 TSP-Proteins kloniert (vgl. 2.8 Gene und Plasmide). Die verkürzte Form machte das Protein leichter exprimierbar und deletierte auch die Endorhamnosidase-Aktivität.

Die Notwendigkeit der Anwendung von Antikörper-Substituten für vielfältige biosensorische Anwendungen beschreiben unter anderem KULAGINA ET AL. (2005). Die Gewinnung und Nutzung hochspezifischer monoklonaler Antikörper ist insbesondere aus ökonomischen und technisch-zeitlichen Gründen nicht immer die ideale Vorgehensweise.
Hier stellen sich Phagenmoleküle oder einzelne Phagenadhesionsproteine als sinnvolle und kostengünstige Alternative dar. Insbesondere die extrem hohe Wirtsspezifität einzelner Phagen macht diese substituierbar im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern. PETRENKO UND SMITH (2000) schlagen den Einsatz ganzer Phagenpartikel als biosensorische

Detektionskomponente vor. Diese können ohne eine Form der Inaktivierung eingesetzt werden und sind in den jeweiligen Wirtskulturen nahezu unbegrenzt selbstreplizierend. Dieser Vorschlag wurde von BALASUBRAMANIAN ET AL. (2007) für Oberflächenplasmonresonanz-Sensoren (SPR) und OLSEN ET AL. (2006) für Quartz-Mikro-Kristallwaagen (QCM-Sensoren) zum Bakteriennachweis umgesetzt. NANDURI ET AL. (2007) setzen einen nativen Phagen zur Detektion des bakteriellen Zellwandproteins β-Galactosidase in Verbindung mit einem SPR-Sensor ein.

In diesem Kontext weisen STEINGROEWER ET AL. (2007) auf die Problematik eines Einsatzes von nativen Phagen hin. Diese können sich als Teil der biosensorischen Detektionskomponente aus der Immobilisierung ablösen und kontaminieren als aktive Phagen-Partikel die Probe. Dies ist insbesondere in der Lebensmitteldiagnostik unerwünscht. Auch kann eine exakte Reproduzierbarkeit und Stabilität mit ganzen Phagen-Partikeln aufgrund der unkontrollierten Replikation und Konzentration nicht garantiert werden. STEINGROEWER ET AL. (2007) schlagen daher die Verwendung rekombinanter Phagenadhesionsmoleküle vor. Auch die Kombinantion mit Magnetic Beads zur Extraktion von Kontaminanten aus einer Probe mit Magnetic Bead-Phagenprotein-Konjugaten wurde in dieser Arbeit realisiert, was auch schon von MARRENBACH (2003) gezeigt werden konnte.

1.6 Diagnostische Immunoassays

Der analytische Nachweis von Analyten mit Antikörpern bezeichnet man als Immundiagnostik. Der Begriff leitet sich von der Immunreaktion des Antikörpers mit dem Analyten bzw. Antigen ab.

Bei Immunoassays können sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper in verschiedenen Funktionen eingesetzt werden. Der vielleicht bekannteste Immunoassay ist der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hierbei wird in der Regel ein Antikörper an eine Festphase, z. B. eine Miktotiterplatte, gekoppelt und separiert den Analyten aus einer komplexen Probenmatrix durch die Immunbindung.

Der extrahierte Analyt wird anschließend präsentiert, sodass ein zweiter Markierungsantikörper mit einem Enzymkonjugat daran ankoppeln kann. Dieses Antikörper-Enzymkonjugat ermöglicht nun eine analytspezifische Enzymreaktion,

wodurch die Anwesenheit des Analyten angezeigt wird. Hierbei kann es sich z. B. um eine Farbreaktion handeln.

Weitere typische Markierungslemente in Kombinantion mit dem Markierungsantikörper können z. B. Farbstoffmoleküle, Fluoreszenz-, Licht- und radioaktive Markierung sein. Je nach der Spezifität des verwendeten Antikörpers lassen sich verschiedene Analyten nachweisen. Kommerziell erhältliche ELISA-Systeme gibt es z. B. für eine Vielzahl von Bakterien (Salmonellen, Streptococcen, Staphylococcen, Legionellen), für Laborwerte der Humandiagnostik (Cholesterin, C-reaktives Protein, HIV, Hepatitis, Polio, Tetanus), aber auch für Bakterienbestandteile wie z. B. Lipopolysaccharide (LPS), Kapselproteine und bakterielle Toxine.

Prinzipiell kann man sagen, dass die Entwicklung eines Immunoassays immer mindestens einen Antikörper zur Bindung des Analyten benötigt. Bei mehreren Antikörpern werden dann neben einer direkten oder kompetitiven Detektion auch so genannte Sandwich-Assays möglich (Abbildung 9); diese zeichnen sich meist durch eine höhere Spezifität aus.

Bei einem Sandwich-Assay erfolgt zuerst die Immobilisierung des Extraktionsantikörpers an den Träger, z. B. einer Mikrotiterplatte. Anschließend wird die Oberfläche gespült und mit einem Blockierungsreagenz belegt, um unpsezifische Bindungen der nachfolgenden Substanzen an den Träger zu verhindern. Nach Zugabe des Analyten wird wieder gespült und anschließend der markierte Detektionsantikörper zugegeben. War in der Probe ein Analytmolekül vorhanden, so kann der Markierungsantikörper daran binden und liefert ein Signal.

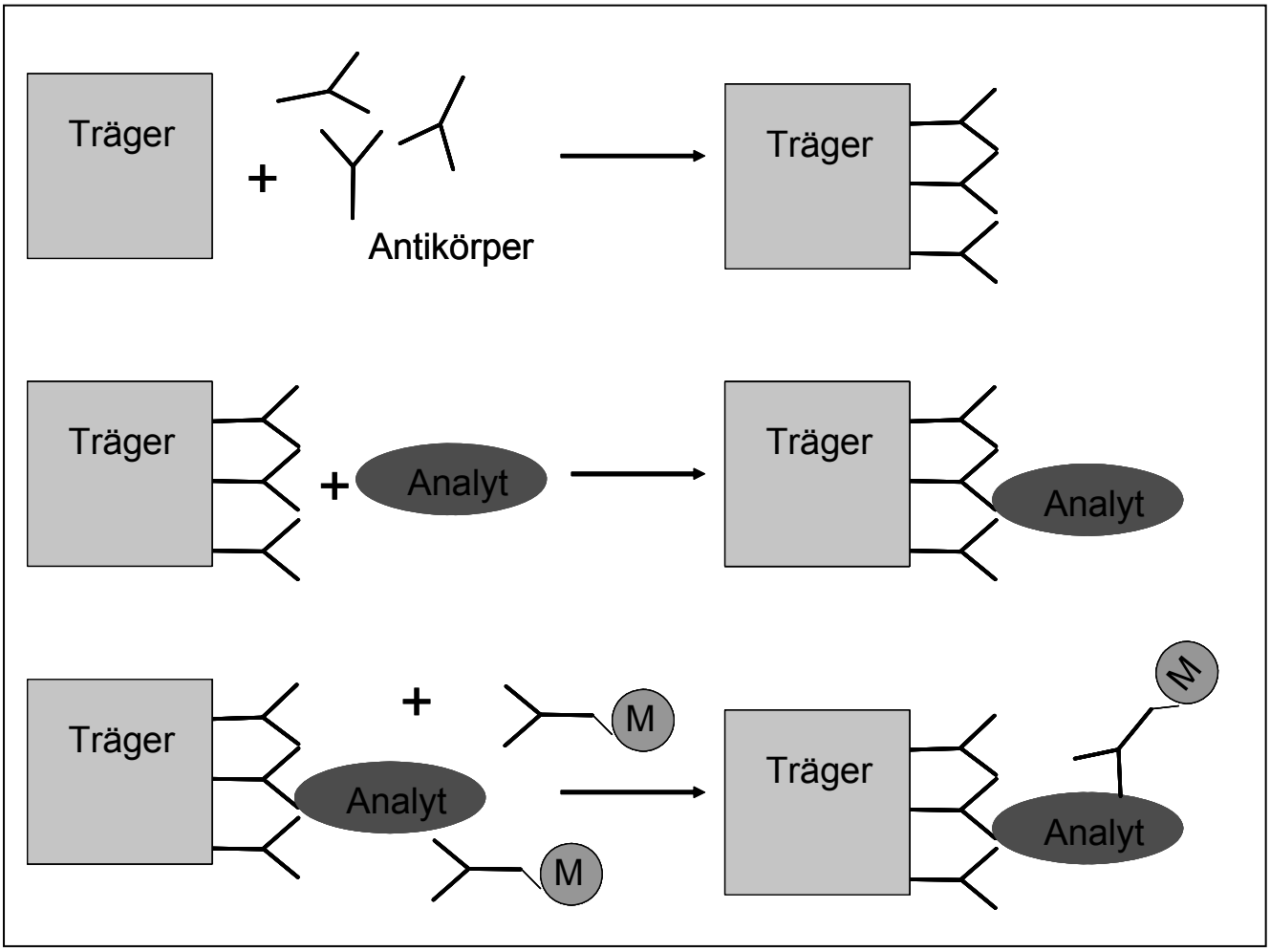


Abbildung 9 Schematische Darstellung eines Sandwich-Assays.

Nach Immobilisierung der Extraktionsantikörper kann ein Analyt gebunden werden. Dieser wird wiederum vom markierten Antikörper erkannt. In diesem Fall kann ein Signal bestimmt werden.

Die Bestimmung des Immunoassay-Signals erfolgt je nach gewünschter Markierung des Antikörpers über photometrische Methoden, durch Ermittlung der Fluoreszenz oder der radioaktiven Signale.

Hierbei ist zu beachten, dass die einzelnen Messsysteme unterschiedliche Anforderungen an die Laborausstattung, an die Erfahrung des Operators und an die Sensitivität des Immunoassays stellen. Weiterhin sollte bei der Wahl des Detektionssystems die Möglichkeit bzw. Notwendigkeit der Probenaufbereitung berücksichtigt sein.

Letztendlich muss die Transportierbarkeit und die Kosten pro Messung bei der Konzeption eines solchen immunologischen Detektionssystems in Betracht gezogen werden.

1.7 Grundlagen der Analyten

1.7.1 Das C-reaktive Protein

Das C-reaktive Protein wurde erstmals um 1930 beschrieben. Hierbei wurde die Präzipitation dieses Blutserumproteins mit Pneumokokken (*Streptococcus pneumoniae*) bzw. ihrem C-Faktor (ein zellwandgebundenes Polysaccharid) beobachtet. Dies führte zur Namensgebung des C-reaktiven Proteins (CRP).

Das CRP ist ein Protein der akuten Phase der menschlichen Immunantwort. Es besteht aus fünf gleichen, jeweils ~23 kDa großen Untereinheiten und hat daher eine Gesamtgröße von ~115 kDa. Die sternähnliche Anordnung der Untereinheiten wird als Pentraxin bezeichnet (vgl. Abbildung 10).

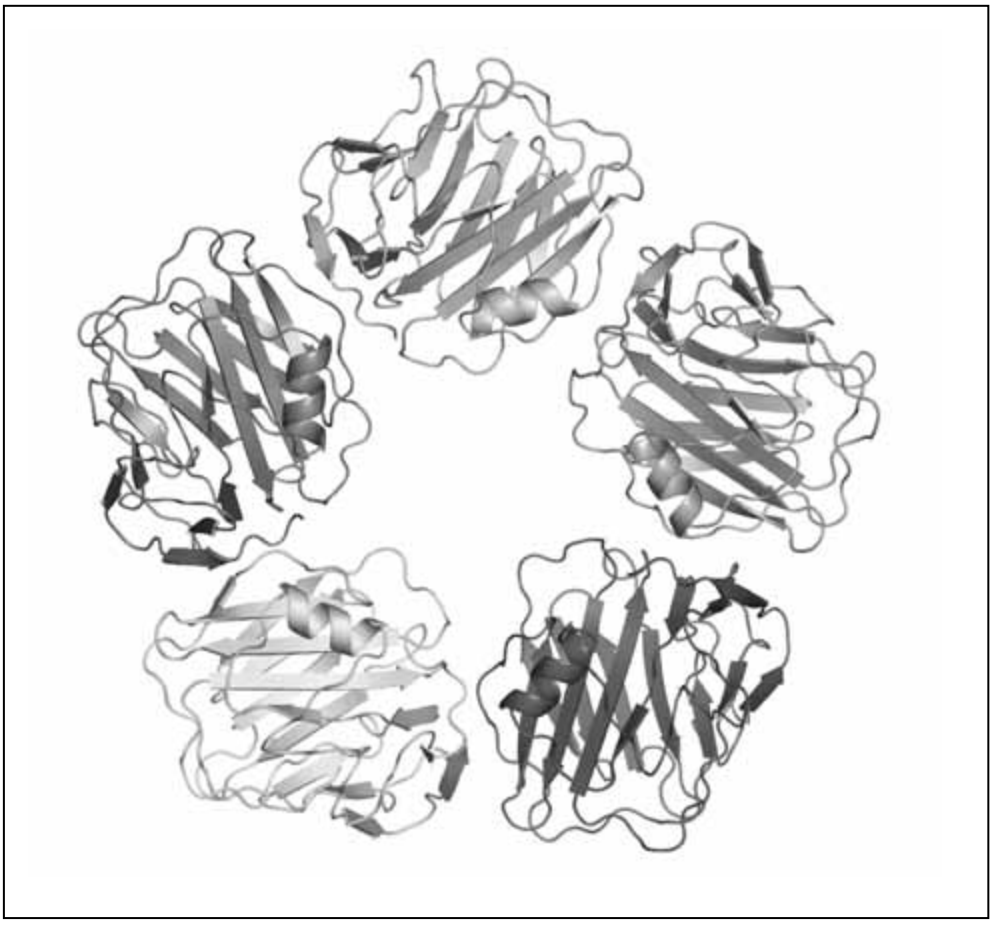


Abbildung 10 Graphische Darstellung eines CRP-Moleküls. (SHRIVE ET AL., 1996, PDB-Code: 1GNH)

Die Bildung von CRP in den Hepatocyten der Leber erfolgt gewöhnlich als Reaktion auf einen Stimulus. Hierbei handelt es sich meist um bakterielle Infektionen. Die Bildung des CRP wird hierbei von Interleukin 6 angeregt. Die Funktion dieses Proteins liegt in der

Stimulation der Phagocytose und der Aktivierung des Komplementsystems als zentrales Element der entzündlichen Immunantwort (BLACK ET AL., 2004).
Das CRP eignet sich daher als Marker für bakteriell verursachte entzündliche Prozesse. Es ist ein unspezifischer Entzündungsparameter. Die Plasmahalbwertzeit beträgt weniger als 24 h, wobei die CRP-Level im Blut ca. 12-24 Stunden nach dem Stimulus signifikant ansteigen. Bei viralen Infektionen wird keine Erhöhung des CRP-Levels beobachtet.

Der Referenzbereich der CRP-Labordiagnostik liegt bei symptomfreien Erwachsenen bei 0-10 mg pro dl Blut. Teilweise wird bereits ab 5 mg pro dl ein auffälliger Wert postuliert. Bei gesunden Erwachsenen ohne entzündliche Prozesse sollte der CRP-Gehalt im Blutserum eigentlich 0 mg/dL sein, da das CRP nur auf einen Stimulus hin gebildet wird. Tatsächlich hat die menschliche Immunantwort aber fast immer eine Aufgabe, was zu typischen CRP-Werten zwischen 0-2 mg CRP pro dl führt.
Der etablierte Nachweis für diesen Blutparameter stellt ein ELISA dar. Die jeweiligen Tests sind gut etabliert und es gibt kommerzielle Systeme mit einer Sensitivität bis zu 0,2 mg/L, die so genannten high sensitivity (hsCRP)-ELISAs (DOMINICI ET AL., 2004; CLARKE ET AL., 2005).

Die CRP-Diagnostik wurde in den letzten Jahren relativ populär, da eine Verbindung zwischen leicht erhöhten CRP-Werten und Arteriosklerose festgestellt wurde (MAZER UND RABBANI, 2004). Hierbei ist noch nicht klar, ob die erhöhten CRP-Werte nur ein Signal für eine bevorstehende Arteriosklerose darstellen, oder ob die Arteriosklerose durch hohe CRP-Level ausgelöst wird (LI UND FANG, 2004). In beiden Fällen ermöglicht das CRP-Monitoring einen wichtigen Zeitvorsprung zur Diagnose und Therapie von Arterienverkalkungen und einem eventuell damit verbundenem Herzinfarkt.
Tatsächlich lässt sich eine Erhöhung der CRP-Konzentration im Blutplasma aber auch durch andere entzündliche Prozesse im Körper erklären, die nur teilweise auf bakterielle Infektionen zurückzuführen sind.
Als typischer Stimulus bakteriellen Ursprungs ist hier die Blutvergiftung (Sepsis), bakterielle Hirnhaut- und Lungenentzündung sowie die Harnwegs- bzw. Blasenentzündung nu nennen. Als nicht unbedingt durch Bakterien ausgelöster Stimulus wird die Blinddarmentzündung und die Gallenblasenentzündung beschrieben. Erhöhte CRP-Werte fanden sich aktuell auch bei Morbus Crohn-Patienten (VERMEIRE ET AL., 2004) und in Verbindung mit Darmkrebs (ERLINGER, 2004).

In allen diesen Fällen ist eine frühe Diagnostik und eine schnelle Probenauswertung sinnvoll. Insbesondere bei Probenmatrices die für etablierte ELISA-Tests bislang nicht zugänglich sind, wie z. B. Speichel (Paradontose, CHRISTODOULIDES ET AL., 2005) und Urin (AL-BAHRANI UND AMMORI, 2005).

Neben den gängigen ELISA-Tests wurden bereits Biosensoren zur CRP-Diagnostik mit verschiedenen Sensorsystemen aufgebaut. Hier sind insbesondere QCM-Immunosensoren (KUROSAWA ET AL., 2004) und Mikro-Cantilever (WEE ET AL., 2005) zu nennen.
Der Einsatz von Magnetic Beads mit magnetischer Detektion unter Verwendung von Induktionsspulen zur CRP-Diagnostik wurde von KRIZ ET AL. (2005) und mit exakt der gleichen Technik und einer etwas schnelleren Probenhandhabung von IBRAIMI ET AL. (2005) beschrieben.
Die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitete Diagnostik von CRP mit SPR und magnetischer Detektion wird in Kap. 3.1 Etablierung eines Biosensors zur Analytik des C-reaktiven Proteins (CRP) auf Basis der Oberflächenplasmonresonanz näher vorgestellt, die technischen Sensorgrundlagen werden in Kap. 1.8 behandelt.

1.7.2 *Yersinia pestis*

Das Bakterium *Yersinia pestis* gehört zur Gruppe der Enterobakterien. Es handelt sich um ein gram-negatives, unbegeißeltes Stäbchenbakterium und ist fakultativ anaerob. *Y. pestis* ist der Erreger der Lungen- und Beulenpest.
Entdeckt wurde *Y. pestis* durch Alexandre Émile Jean Yersin im Jahre 1894 an Leichen mit ungewöhnlichen Beulen in Hong Kong. Er benannte das neue Bakterium nach seinem Mentor Pasteur, es wurde aber später nach seinem Entdecker umbenannt (MOLLARET, 1995).

Die Pest hat weltweit, insbesondere im Mittelalter, Millionen von Opfer verursacht. Typische Formen der Pest sind beulenförmige Hautinfektionen nach Insektenbissen, hier hauptsächlich übertragen durch den Rattenfloh (*Xenopsylla cheopsis).* Aber auch andere blutsaugende Insekten können eine Hautinfektion mit *Y. pestis* verursachen. Diese Krankheitsform bezeichnet man als Beulenpest. Die Beulen (Bubonen) bestehen aus geschwollenem Ober- und Unterhautgewebe, Bakterienansammlungen und Eiter.
Eine weitere Form der Pest entsteht nach Kontakt mit Bakterien-Aerosolen und Aufnahme von *Y. pestis* in die Lunge. Das Bakterium persistiert nun in den Lungenalveolen und führt

durch Phagocytose zu einer signifikanten Verringerung des aktiven Lungenepithels. Hierbei spricht man von der Lungenpest.

Das Krankheitsbild der Beulenpest ist deutlich länger als das der schnell verlaufenden Lungenpest. Beide Formen sind ohne Behandlung tödlich, hierbei erfolgt ein toxischer Schock durch bakterielle Toxine, verbunden mit nekrotischen Reaktionen der Nieren und Leber. Das Auftreten von Pesterkrankungen ist meldepflichtig (§7, IFSG, 2001). Durch Gabe geeigneter Antibiotika können heutzutage beide Krankheitsformen der Pest schnell und effektiv behandelt und geheilt werden. Tatsächlich werden Krankheitsfälle durch *Y. pestis* noch in ca. 20 Ländern der Welt, hauptsächlich in Ost-Afrika, Asien und Indien gemeldet (PERRY UND FETHERSTON, 1997).

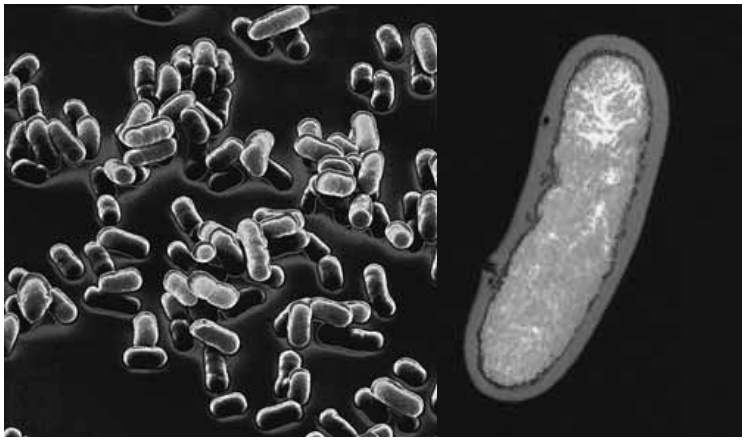


Abbildung 11 Mikroskopische Darstellung von *Yersinia pestis*.

Links: Darstellung in Gewebe. Man erkennt die häufig vorkommendene Duplex-Form aus zwei frisch getrennten Bakterien. Rechts: Immunologische Färbung der *Yersinia pestis*-Kapselstruktur in rot. (Bildquelle: http://concise.britannica.com)

Die Diagnostik von *Y. pestis* erfolgt aus Blut oder eitriger Bubonenflüssigkeit des infizierten Lebewesens. Hierbei kann ein Bakteriennachweis durch mikrobiologische Plattierung und Charakterisierung oder ein Antikörper-Nachweis erfolgen. Aufgrund der schwierigen Kulturbedingungen dauern mikrobiologische Nachweise von *Y. pestis* ca. 1 Woche.

Antikörper-basierte Nachweise richten sich gegen das *Yersinia pestis* Fraktion 1 (YPF1)-Kapselprotein oder das vom Bakterium sekretierte low-calcium-response V-Protein

(V-Antigen, LcrV-Protein) in der Probenflüssigkeit (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003).

Während das LcrV-Protein als Virulenzfaktor in allen *Y. pestis*-Stämmen vorkommt (GOMES-SOLECKI ET AL., 2005), werden sowohl F1-positive als auch seltene F1-negative Stämme beschrieben (ANIMISOV ET AL., 2004). Das F1-Protein wirkt anti-phagocytotisch gegenüber den Fresszellen der wirteigenen Immunabwehr und ist daher obligat notwendig für eine Persistenz des Bakteriums in seinem Wirt. Schwerwiegende Infektionen mit *Y. pestis* ohne Selbstheilung werden also immer durch F1-positive Stämme verursacht. Da das F1-Protein nur in der Zellwand bzw. Kapsel des lebenden oder toten Bakteriums vorkommt und nicht in die bakterielle Umgebung sekretiert wird, eignet es sich als Nachweis-Antigen deutlich besser (BENNER ET AL., 1999).

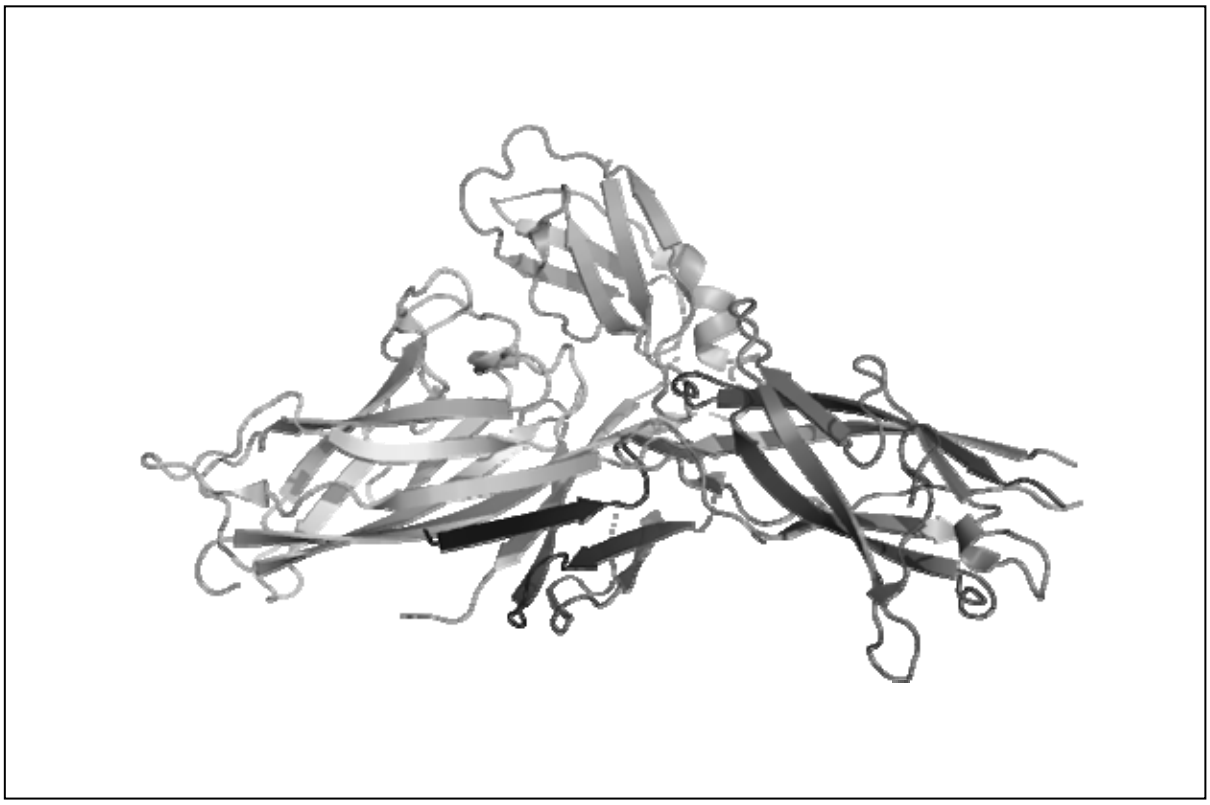


Abbildung 12 **Modell-Darstellung eines *Yersinia pestis* F1-Kapsel-Proteins**. (ZAVIALOV ET AL., 2003, PDB-Code: 1P5U)

Der Einsatz von *Y. pestis* als biologisches Kampfmittel ist bereits seit der Antike bekannt. Das Katapultieren von Pesttoten in belagerte Städte und das freundliche Überlassen von Lebensmitteln oder Kleidung, versetzt mit pestübertragenden Flöhen oder pesterreger-haltigen Flüssigkeiten wurde von verschiedenen Kulturen eingesetzt. Auch das Vergiften von Brunnen mit Pesterregern war selbst im Mittelalter noch Mittel der Wahl bei Belagerungen. Mit Beginn des Technologiezeitalters und besseren Erkenntnissen über *Y. pestis* wurde dieses als sprühfähiges Aerosol eingesetzt. Biologische Kampfmittel wurden nach dem zweiten Weltkrieg geächtet und deren Nichtnutzung 1975 in der Biological and Toxin Weapons Convention (BTWC) von 143 Staaten ratifiziert.
In Zeiten ansteigender Bio-Terrorismus-Gefahr wird das Auftauchen von *Y. pestis*-Infektionen von Seiten der Behörden kritisch beobachtet. Insbesondere die weltweit relativ einfache Verfügbarkeit des Bakteriums aus natürlichen Vorkommen stellt nach Expertenansicht eine große Gefahr dar (RIEDEL, 2005).

Den sensitivsten *Y. pestis*-Nachweis bieten PCR-basierte Systeme. Hiermit können Bakterienzahlen von bis zu 50 cfu erkannt werden (CHASE ET AL., 2005; HINDSON ET AL., 2005; SELVAPANDIYAN ET AL., 2005). Ähnlich sensitiv ist der von RIDER ET AL. (2003) beschriebene CANARY-Sensor. Dieser basiert auf einem System von biolumineszenten B-Zellen. Beide Techniken zeichnen sich aber durch ihre hohe Systemkomplexität, Probendauer und Kosten nicht als transportables Schnelldiagnose-System aus.
Verschiedene ELISA-basierte Systeme für die Diagnostik von *Y. pestis* anhand des F1-Antigens (SPLETTSTOESSER ET AL., 2004) und des LcrV-Proteins (GOMES-SOLECKI ET AL., 2005) wurden ebenfalls bereits etabliert.

1.7.3 *Francisella tularensis*

Erstmals 1912 von Charles Chapin beschrieben, wurde *Francisella tularensis* als Verursacher der von Edward Francis dokumentierten Tularemie identifiziert. Die erste Einordnung dieses gram-negativen, fakultativ anaeroben und unbegeißeltem, kokkoidem Stäbchenbacillus erfolgte wie die jetzigen *Yersinien* in die Gattung *Pasteurella.* Die endgültige Namensgebung erfolgte zu Ehren von Edward Francis und nach dem Ort der Entdeckung, Tulare County in Kalifornien, USA.

F. tularensis ist ein hoch-infektiöses Bakterium; bereits 10-50 Organismen in Form eines Aerosols können eine bakterielle Zoonose, die so genannte Tularemie, auslösen.

Nachgewiesene Infektionen mit *F. tularensis* sind nach §7 des Infektionsschutzgesetzes (IFSG) meldepflichtig. Als tierische Reservoirs dienen hauptsächlich Nager, als Infektionsvektor fungiert eine Vielzahl blutsaugender Ektoparasiten wie z. B. Flöhe, Zecken und Lausfliegen (PETERSEN UND SCHRIEFER, 2005), bei deren Biss mehrere Millionen Erreger in die Blutbahn des Opfers gelangen können. Ein weiterer Infektionsweg ist über tote oder geschlachtete Tiere, hier insbesondere über Blutinfektionen. *F. tularensis* ist cryostabil, aber thermolabil. In Schlamm und verunreinigtem Wasser kann *F. tularensis* mehrere Wochen infektiös bleiben.
Bei *F. tularensis* wurden bislang zwei unterschiedliche Serovare identifiziert:

- *Francisella tularensis biovar tularensis* (Typ A)
- *Francisella tularensis biovar palaearctica* (Typ B)

Während Typ A als sehr gefährliche Form hauptsächlich in Nordamerika vorkommt, ist die mildere Variante *palaearctica* (Typ B) mit weltweiter Verbreitung auch in Europa anzutreffen.

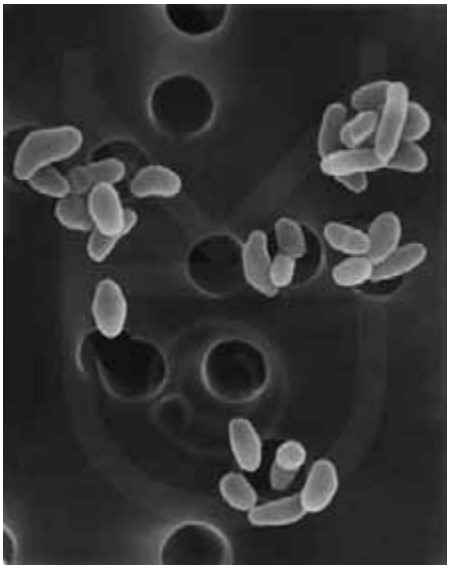


Abbildung 13 Elektronenmikroskopische Darstellung von *Francisella tularensis*.
(Bildquelle: Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Copyright © 2005)

Die von *F. tularensis* ausgelöste Tularemie ist eine extrem gefährliche und tödliche Krankheit. Befallene Tiere können innerhalb kurzer Zeit ganze Populationen eliminieren. Manche der befallenen Tiere dienen aber als Langzeitwirt und somit der Verbreitung des Erregers. Aufgrund seiner teilweise radikalen Wirkung auf Hasen und Kaninchen und ihrem zur Pest vergleichbaren symptomatischen Erscheinungsbild wird die Tularemie auch als Hasenpest bezeichnet.
Die Symptome eines befallenen Menschen können von Hautentzündungen und geschwollenen, eitrigen Hautläsionen bis hin zu einer Lungenentzündung und Multi-Organ-Versagen reichen. Die humanen Mortalitätsraten sind je nach Behandlungsbeginn relativ hoch, selbst unter idealer Antibiotikatherapie beträgt sie bei Typ A noch mehr als 10 % (SPLETTSTOESSER UND TOMMASO, 2005).

Auch *F. tularensis* eignet sich aufgrund seiner ubiquitären Verfügbarkeit und hohen Letalität als biologisches Kampfmittel. Hier birgt insbesondere der Einsatz als lungengängiges Aerosol das höchste Gefährdungspotential.
Einen solchen Kampfmitteleinsatz von *F. tularensis* als Aerosol halten mehrere Quellen bereits für realisiert (DENNIS ET AL., 2001).

Neben dem extrem komplizierten mikrobiellen Nachweis von *F. tularensis* werden hauptsächlich PCR-basierte Systeme eingesetzt (CHRISTENSEN ET AL., 2006; TOMIOKA ET AL., 2005). Wie bei der Detektion von *Yersinia pestis* handelt es sich dabei um sehr sensitive, aber auch komplexe Analysensysteme mit einem hohen Material-, Zeit- und Kostenaufwand.
Immunologische Nachweise von *F. tularensis* beziehen sich fast ausschließlich auf einen Zellwandbestandteil von *F. tularensis* (VINOGRADOV ET AL., 2002), das so genannte *F. tularensis* Lipopolysaccharid (LPS).
Lipopolysaccharide werden für eine Vielzahl von Organismen beschrieben, sie zeichnen sich aber alle durch eine unterschiedliche Struktur aus und sind daher bakterienspezifisch. SCHMITT ET AL. (2005) beschreiben z. B. einen ELISA-basierten Immunoassay zum Nachweis von *F. tularensis* Infektionen.

1.7.4 *Clostridium botulinum*

Das Bakterium *Clostridium botulinum* wurde 1895 von Ermile van Ermengem erstmals isoliert. Seine tödliche Wirkung als Lebensmittelvergifter war zu dieser Zeit bereits bekannt, nur die Ursache der Lebensmittelvergiftung kannte man noch nicht. *C. botulinum* ist als Mitglied der Gattung *Clostridium* ein obligat anaerobes und gram-positives Stäbchenbakterium. Wie die anderen Clostridien verfügt auch *C. botulinum* nicht über die H_2O_2 und Sauerstoffradikale-abbauenden Enzyme Katalase und Superoxid-Dismutase. *C. botulinum* ist daher sehr sensitiv für jede Form von Sauerstoffkontakt. Im Gegensatz zu anderen Clostridien wie z. B. *Clostridium tetani* hemmt Sauerstoff bei *C. botulinum* aber hauptsächlich nur das Wachstum (FRITSCHE, 1999). Zur vegetativen Überdauerung werden geringe Mengen Sauerstoff durchaus toleriert. Zur nicht vegetativen Überdauerung bildet *C. botulinum* Endosporen. Diese sind extrem hitzestabil und führen bei ihrer Reifung in der Bakterienzelle zur Ausbildung der typischen Drumstick-Struktur (siehe Abb. 14).

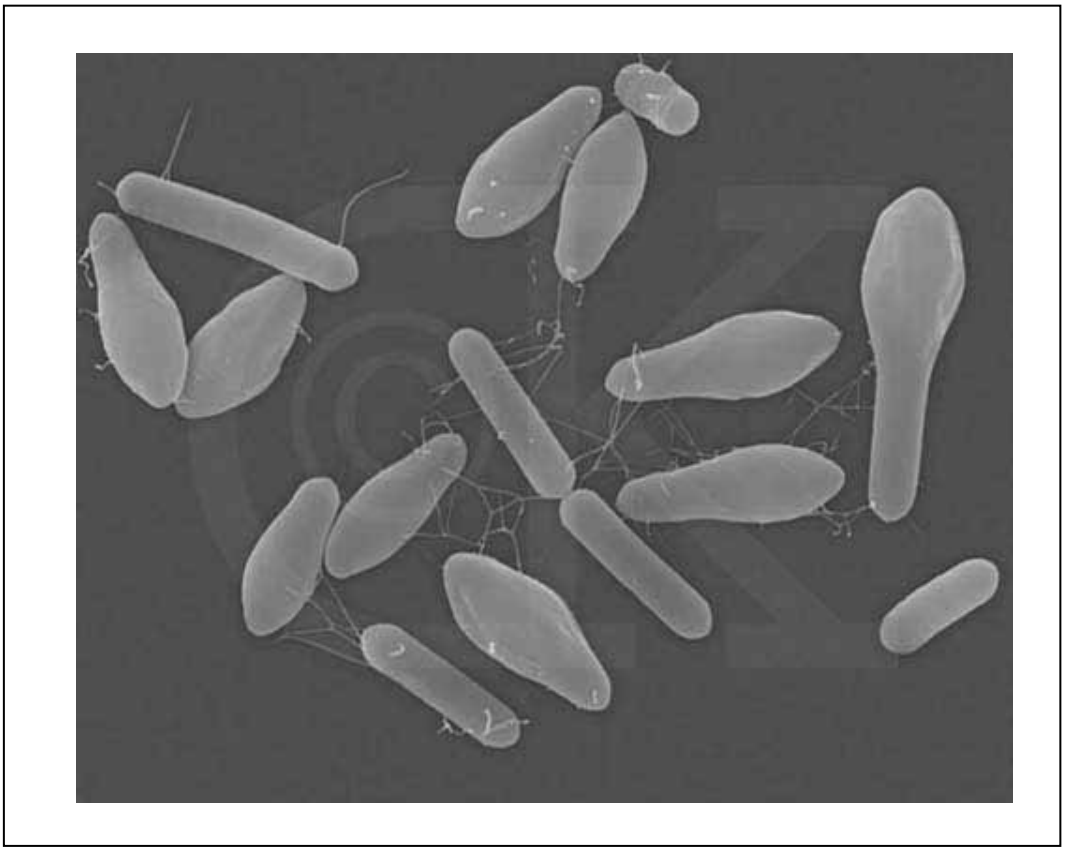


Abbildung 14 **Elektronenmikroskopische Darstellung von *Clostridium botulinum*.** Man erkennt die normale Stäbchenform und die sporenbildende Drumstick-Form. (Bildquelle: Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Copyright © 2005)

Das natürliche Vorkommen von *C. botulinum* ist in Sedimenten von Seen und Tümpeln. Die Sporen von *C. botolinum* kommen aber sowohl in Erde als auch in natürlichen Stäuben (z. B. Sand, Lehm etc.) vor. Eine natürliche Anreicherung von *C. botulinum* Sporen erfolgt in Honig (bis ca. 10 cfu pro ml). Die Sporen sammeln sich nach Lufttransport in Stäuben am Blüten und Nektar einiger Pflanzen und werden von Bienen mit eingesammelt (NEVAS ET AL., 2002).

Man unterscheidet zwei Formen von *C. botulinum*. Zum einen der proteolytische Typ mit extrem hoher Hitzestabilität der Sporen und einer hohen Toleranz gegenüber niedrigen Wassergehalten. Zusätzlich gibt es einen saccharolytischen Typ, welcher etwas empfindlicher gegenüber Temperatur und Salzgehalt ist. Der saccharolytische Typ kann aber bei Temperaturen unterhalb 10°C immer noch wachsen (KREMER, 2002).

C. botulinum ist ein gefürchteter Lebensmittelkeim. Häufig kommt es zu einer Kontamination von zu verarbeitenden Lebensmitteln durch sporenhaltige Luftstäube. Durch die starke Hitzestabilität der Endosporen (D_{100} = 25 min) kann es zu auskeimfähigen Sporen in bereits sterilisierten Lebensmitteln kommen. Da *C. botulinum* für sein Wachstum ein anaerobes Medium benötigt, sind insbesondere Konserven und verarbeitete Lebensmittel unter Schutzgasatmosphäre gefährdet. Proteolytische *C. botulinum* wachsen aufgrund des hohen Angebotes an Proteinen besonders gut in Wurstkonserven. Kontaminierte Lebensmittel fallen oftmals durch die erhöhte Gasansammlung und somit durch eine Aufblähung des Behältnisses auf. Solche Konserven werden als Bombagen bezeichnet und sind hochgiftig (KREMER, 2002).

Das von *C. botulinum* gebildete Toxin ist das stärkste bakterielle Toxin. Es wird nur von wachsenden Bakterienkulturen gebildet und lässt sich in mehrere verschiedene Untergruppen mit jeweils leicht unterschiedlichem Wirkort und Wirkdauer einteilen. Die wichtigsten Formen sind Botox A und B. Ferner kommen die klinisch unbedeutenden Formen C-F vor. Das *C. botulinum* Toxin (Botox) wird als ungiftige Vorstufe durch das Bakterium sezerniert. Das eigentlich aktive Toxin ist eine Metalloprotease. Diese wird erst durch andere bakterielle Proteasen mittels einer Spaltung der Vorstufe in zwei unterschiedliche Ketten fertig gestellt.

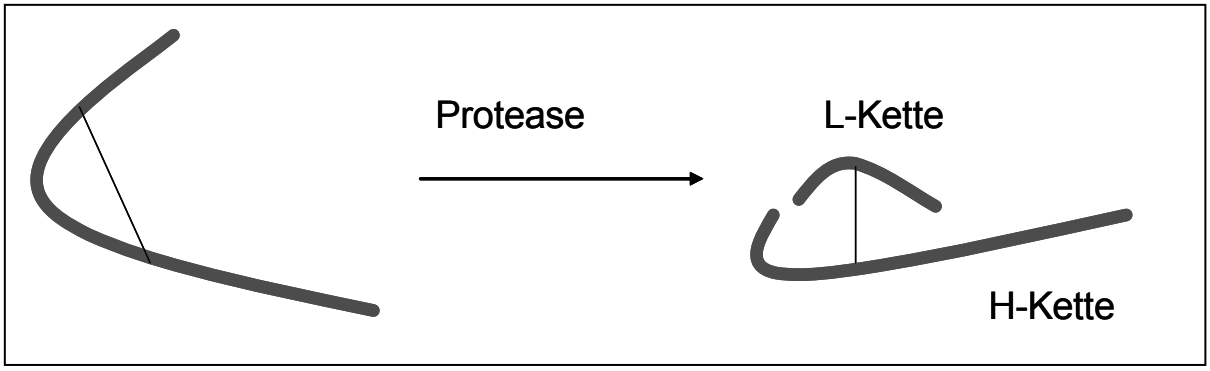


Abbildung 15 **Spaltung der Botox-Vorstufe zum fertig prozessierten Protein.** Beide Ketten sind über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden. Nach KREMER (2002).

Hierbei entsteht eine leichte (L)-Kette mit ca. 50 kDa und eine schwere (H)-Kette mit ca. 100 kDa. Das Gesamtgewicht des Toxins liegt also bei ca. 150 kDa.
Das bakteriell sezernierte Botox liegt aber noch nicht in dieser Form vor. Vielmehr wird die beschriebene Struktur (S-Komplex) immer assoziiert an ein größeres Protein sezerniert. In dieser Form als Toxoid ist das Botox-Enzym noch nicht aktiv. Erst im Magen eines Wirtes wird bei Passage der Darmwand die höher aggregierte Struktur aufgelöst und aus dem Toxoid wird die S-Struktur, das Toxin freigesetzt. Nun ist die Metalloprotease fertig prozessiert und liegt aktiv im Wirt vor.
Das Botox gehört zu den Neurotoxinen. Es katalysiert die Protolyse von Proteinkomponenten des Neuroexozytoseapparates in den motorischen Endplatten. Hierdurch wird eine Verschmelzung der Acetylcholin-haltigen Vesikel mit der Endplatte verhindert und eine Freisetzung von Acetylcholin unterbunden. Durch diesen Vorgang ist jede Form der Reizweiterleitung, auch der Grundtonus eines Nervs, unterbrochen (KAYSER ET AL., 1997).
Die letale Dosis des Menschen für Botox liegt bei 1 ng pro kg per orale Aufnahme. Die Symptome sind Sehprobleme, Bewegungsunfähigkeit und anschließend der Verlust jeglicher motorischer und vegetativer Kontrolle. Häufig tritt der Tod durch Atemstillstand ein.

Botox hat aufgrund seiner Anwendung in der Medizin seine Wahrnehmung in der Öffentlichkeit verändert. Wurde Botox vor 25 Jahren ausschließlich zur Behandlung von Dystonien oder chronischen Muskelkrämpfen eingesetzt, so hat es durch die kosmetische Chirurgie mittlerweile einen hohen Stellenwert bei der Korrektur von mimischer

Gesichtsfalten. Diese werden durch Stilllegung der Gesichtsmuskulatur geglättet. In der medizinischen Anwendung hat sich Botox Typ A etabliert. Dieses weist eine Standzeit in der Nervenzelle von ca. 6 Monaten auf. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete und ebenfalls medizinisch einsetzbare Botox B wirkt nur wenige Wochen.
Durch die hohe Medienpräsenz von Botox wird die Gefahr dieses Toxins unterschätzt.

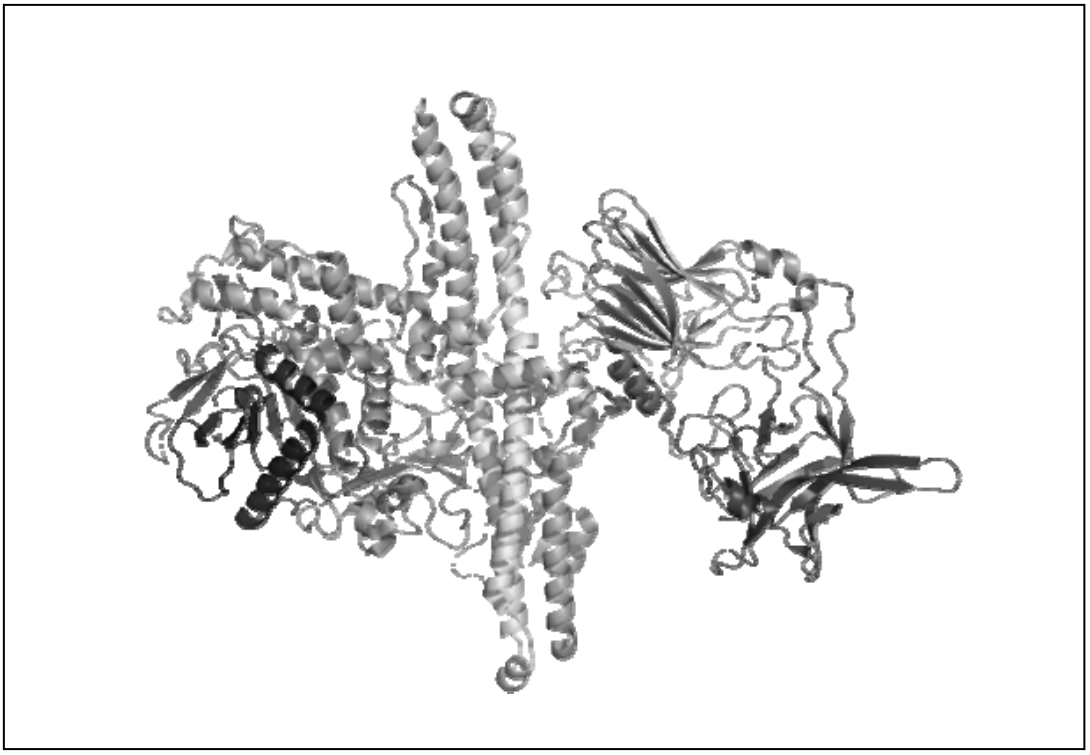


Abbildung 16 **Modelldarstellung des *Clostridium botulinum* Toxin B.** (SWANIMATHAN UND ESWARAMOOTHY, 2002, PDB-Code: 1EPW).

Der klassische Nachweis von *C. botulinum* erfolgt per Injektion einer Probe in ein Labortier, vornehmlich Mäuse. Die letale Wirkung des *C. botulinum* Toxins stellt sich nach 12-36 Stunden ein.
Die Detektion von *C. botulinum* kann ebenfalls ganz allgemein per PCR erfolgen. Hierbei können sowohl wachsende Zellen als auch die ebenfalls DNA-haltigen Sporen nachgewiesen werden (HIELM ET AL., 1996 und FACH ET AL., 1996).
Teilweise wird auch ein kombinierter Einsatz von PCR und Toxinnachweis eingesetzt. Der Nachweis des Botox muss hierbei nicht zwangsläufig per Mausinjektion erfolgen. Mittlerweile sind mehrere ELISA-basierte und biosensorische Detektionsmethoden beschrieben worden. So setzen GUGLIELMO-VIRET ET AL., 2005 einen Assay mit

chemilumineszenten Zellen zur Detektion von Botox B ein. Die Verwendung von QCM-Mikrowaagen mit Antikörpern gegen Botox A beschreiben O´BRIEN ET AL. (2000). Ein ähnliches Prinzip mit einem faseroptischen Detektionselement wurde 1992 von OGERT ET AL. vorgestellt.

Ein sicherer und schneller Nachweis des *C. botulinum* Toxins ist notwendig, da *C. botulinum* ebenfalls zu den leicht erreichbaren B-Waffen gehört (BROUSSARD, 2001).

1.7.5 *Mycobacterium paratuberculosis*

Das Bakterium *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) wird im Allgemeinen als *M. paratuberculosis* bezeichnet. Es ist der Erreger der insbesondere bei Rindern (*Bos taurus*) weit verbreiteten Paratuberkulose, die aber auch bei anderen Weidetieren auftreten kann.

Die Gattung der *Mycobakterien* zeichnet sich durch mehrere Alleinstellungsmerkmale im Vergleich zu anderen Bakteriengattungen aus. Ihr Zellwandaufbau ist zwar ähnlich zu denen der gram-positiven Gruppe, sie lassen sich aber nur schwer anfärben. Ihr Habitus sind längliche Stäbchen, sie sind aber morphologisch sehr variabel. Ihr Vorkommen ist immer parasitisch, das Wachstum sehr langsam.

Als zusätzlichen Schutz gegen Umwelteinflüsse bzw. gegen die Immunabwehr des Wirts bilden sie durch einen erhöhten Lipidanteil eine wachsähnliche Zellwand. Die Zellwände enthalten außerdem ein spezielles Lipopolysaccharid, das Lipoarabinomannan (LAM). Es ist für jede der verschiedenen Mycobacterium-Arten spezifisch (MUNJAL ET AL., 2004; MENDELSON ET AL., 2005).

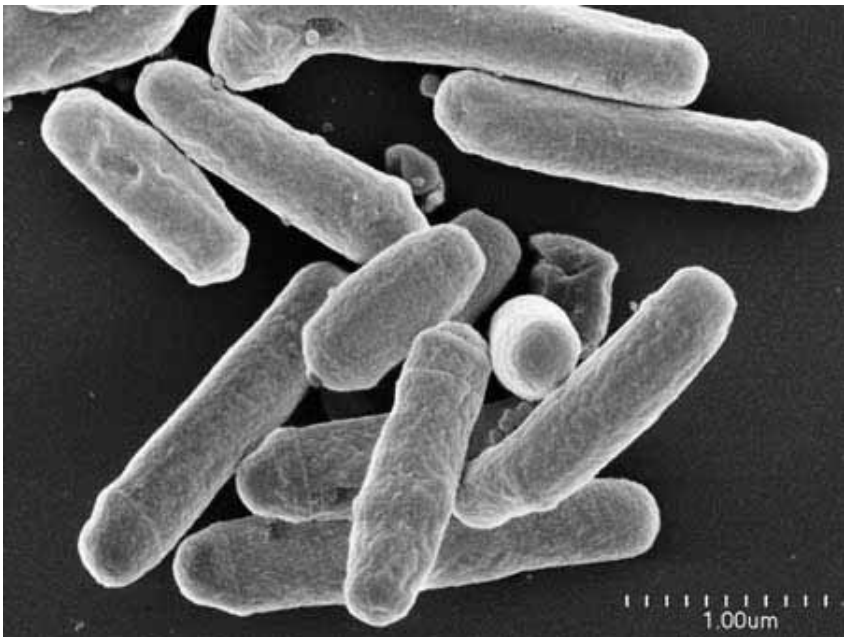


Abbildung 17 **Elektronenmikroskopische Darstellung von *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis.*** (Bildquelle: http://www.nsgs.it)

Die Paratuberkulose (John'sche Krankheit) ist eine entzündliche Darmerkrankung, die sich auch auf andere Organe und Gewebe ausweiten kann. Es handelt sich um eine in Deutschland meldepflichtige Tierseuche. Die Infektion der Rinder erfolgt häufig durch eine orale Aufnahme nach Schmierinfektion von Futter oder Wasser mit Kot. Zusätzlich sind Infektionen von Kälbern bei der Geburt, durch Aufnahme von Kolostrum (Erstmilch) oder durch Kontakt der leckenden Kälber untereinander bekannt (VAN ROERMUND ET AL., 2007). Die Inkubationszeit bis zur Ausbildung einer manifesten Enteritis kann insbesondere bei infizierten Kälbern mit 2-3 Jahren sehr lang sein. Zusätzlich sind langsamere, chronische Verläufe und nicht-erkrankende Dauerausscheider bekannt (HARRIS UND BARLETTA, 2001).

Im Verlauf der Paratuberkulose kommt es zu Durchfällen und einer Abmagerung des Tieres. Neben dem Darm wird häufig auch der Euter der Kuh in Form einer Mastitis befallen, wodurch Kälber infiziert und Milch kontaminiert werden kann. Letztendlich führt die starke Abmagerung, Appetitlosigkeit und Apathie der befallenen Rinder zu deren Tod, wobei identifizierte Tiere sofort aus dem Bestand entfernt werden sollten. Eine Therapie

befallener Tiere ist aufgrund der schlechten medikamentösen Zugänglichkeit des Erregers nur sehr bedingt möglich (TIWARI ET AL., 2006).

Aufgrund des sehr langsamen Wachstums und dem somit hohen Kultivationsaufwand dauern mikrobiologische Nachweise von *M. paratuberculosis* je nach Medium zwischen 6 und 16 Wochen (TIWARI ET AL., 2006). Deutlich schneller und sensitiver sind PCR-basierte Methoden, wie z. B. von COOK UND BRITT (2007) mit einer Analysendauer von nur wenigen Tagen und einer Sensitivität von ca. 100 Bakterien.
Weit verbreitet sind auch ELISA-basierte Methoden. Diese sind weniger sensitiv als PCR und erfordern je nach Probenmatrix (in der Regel Kot) auch eine Aufarbeitung der Probe mit bakterieller Extraktion.
Als zur ELISA-Detektion verwendetes Antigen kann hierbei ein bakterielles Protein nach einer Zelllyse verwendet werden. Alternativ richtet sich der ELISA gegen das bereits erwähnte Lipoarabinomannan (LAM) der bakteriellen Zellwand. Ein Vergleich kommerziell erhältlicher und zugelassener ELISA-Tests zeigte einen leichten Vorteil für die Detektion des LAM in einem Sandwichverfahren. Insgesamt sind aber alle bisher verfügbaren Tests nicht zufrieden stellend (MCKENNA ET AL., 2006). Einen Versuch zur Automatisierung eines ELISA zur Detektion von Antikörpern der Immunanatwort gegen *M. paratuberculsosis* (a-ELISA) wird von WU ET AL. (2006) beschrieben. Hierdurch wird die schnelle Evaluation ganzer Herden ermöglicht.
Ein weiterer interessanter Aspekt der *M. paratuberculosis*-Forschung beschäftigt sich mit dem Zusammenhang zu Morbus Crohn. Es wurde wiederholt ein Befall des Darms von Morbus Crohn-Patienten mit *M. paratuberculosis* beschrieben. Dies ist aber nicht bei allen Patienten der Fall.
Ein Kontakt zwischen Mensch und *M. paratuberculosis* ergibt sich hauptsächlich über Milch und Milchprodukte. So ist eine Kontamination von Rohmilch leicht nachvollziehbar (s. o.). Anscheinend übersteht *M. paratuberculosis* aber auch in seltenen Fällen eine Pasteurisation oder milchsaure Verarbeitung zu Rohmilchkäse und kann dann über orale Aufnahme in den menschlichen Darm gelangen (GRANT, 2003).
Ein Zusammenhang zwischen *M. paratuberculosis* und Morbus Crohn wird in der Wissenschaft seit mehreren Jahren sehr kontrovers diskutiert. Als gemeinsame Grundmeinung kann festgehalten werden, dass anscheinend ein bakterieller Auslöser an der Entstehung und Ausprägung dieser eigentlichen Auto-Immunerkrankung beteiligt ist

(BEHR UND SCHURR, 2006). Dieser bakterielle Auslöser ist wahrscheinlich *M. paratuberculosis*.
Dieses Bakterium kann aber nicht die alleinige Ursache für Morbus Crohn sein, trotzdem ist eine Form der Verbindung zwischen *M. paratuberculosis* und Morbus Crohn nachvollziehbar (SHANAHAN UND MAHONEY, 2005).

1.7.6 *Salmonella typhimurium*

Das Enterobakterium *Salmonella enteritica subsp. enteritica* Serovar Typhimurium ist vor allem unter seiner früheren Bezeichnung *Salmonella typhimurium* bekannt. Die Namensgebung stammt von einer ersten Beschreibung als Erreger des Mäusetyphus, wobei auch andere Säugetiere und Menschen infiziert werden können.
Die nach dem Tierarzt Daniel E. Salmon benannte Gattung gehört wie *Escherichia* zu den ubiquitär vorkommenden Enterobakterien. Salmonellen sind gram-negativ und fakultativ aerob. Sie gehören aufgrund der peritrichen Begeißelung zu den stark beweglichen Bakterien. (KREMER, 2002). Die Gattung Salmonella umfasst nur die Arten *S. enteritica* und *S. bongori*, wobei *S. enteritica* in ca. 2500 Unterarten und Serovare aufgeteilt wird.

Die Gattung der Salmonellen wird in die pathogene Typhi/Paratyphi- (z. B. *S. enteritica subsp. enteritica* Serovar Typhi), und die harmlosere Enteritidis-Gruppe (*S. enteritica subsp. enteritica* Serovar Enteritidis und *S.* Typhimurium) unterteilt (TINDALL ET AL., 2005). Hierbei lösen die Vertreter der Typhi-Gruppe die typischen Symptome dieser Krankheit in Form blutiger Durchfälle aus. Die Salmonellen der Enteritidis-Gruppe führen nur zu wässrigen Durchfällen, die oft auch ohne Gabe von Antibiotika rasch abklingen und nur für immunschwache Patienten und allgemein aufgrund der einhergehenden Dehydrierung problematisch sein können. Nachgewiesene Infektionen mit Salmonellen beider Gruppen sind meldepflichtig (§7, IFSG, 2001).

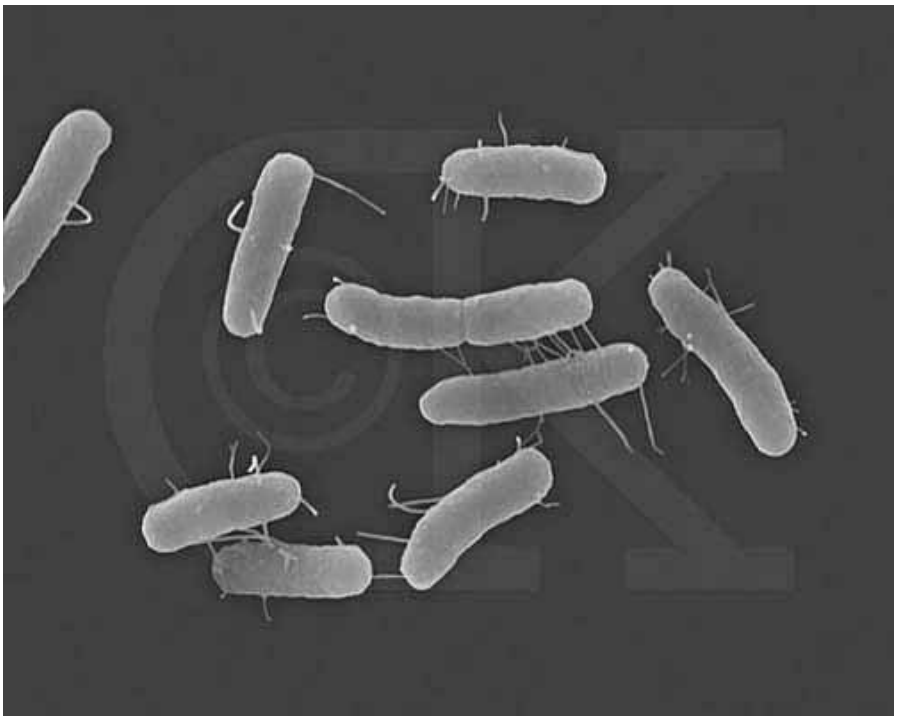


Abbildung 18 Elektronenmikroskopische Darstellung von *Salmonella enteritica subsp. enteritica* Serovar Typhimurium. Man erkennt die peritriche Begeißelung der Organismen. (Bildquelle: Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Copyright © 2005).

Die Übertragung der Salmonellen erfolgt meist fäkal-oral durch Schmierinfektionen, anfällig hierfür sind oftmals Großküchen und Lebensmittelverarbeitende Betriebe. Allein in den USA treten jährlich ca. 1 Million Fälle von Salmonellosen mit der Enteritidis-Gruppe auf, hiervon enden ca. 500 Fälle tödlich. Etwa 95 % aller Salmonellosen erfolgen durch Lebensmittelvergiftungen (MEAD ET AL., 1999).

Die Infektionsdosis für den erwachsenen Menschen liegt bei 10^4 bis 10^6 Keimen. Wenn sich Salmonellen in stark fetthaltigen Lebensmitteln wie Käse, Hamburger, Schokolade, Salami oder auch Gewürzen befinden, oder bei besonderer Disposition, z. B. Abwehrschwäche (Säuglinge, Kleinkinder, alte Menschen), sind jedoch Erkrankungen bereits bei Infektionsdosen unter 100 Keimen beobachtet worden (KREMER, 2002).

Die klassische Nachweismethode für Salmonellen ist mikrobiologisch. Die Erreger werden in einem Nährmedium angereichert und anschließend auf speziellen Selektionsmedien kultiviert (JUNE ET AL., 1996). Obwohl diese Methode sehr arbeits- und zeitintensiv ist, bleibt sie doch insbesondere in der Lebensmittelindustrie weit verbreitet (AUGUSTIN UND

CARLIER, 2006). Dies liegt hauptsächlich an den erreichbaren Sensitivitäten und der unkomplizierten Methodik. Die Lebensmittelverordnung schreibt vor, dass Lebensmittel frei von Salmonellen sein müssen. Kontaminationen von wenigen Bakterienzellen können somit nur durch Kultivierung erkannt werden.

Die exakte Serotypisierung der Salmonellen erfolgt üblicherweise nach dem von Kauffmann und White entwickelten Schema. Hierbei werden verschiedene Charakteristika der Bakterien immunologisch mit speziellen Antikörpern erfasst.
Bei dem O-Antigen handelt es sich um ein zellwandgebundenes Lipopolysaccharid (LPS). Der Aufbau des LPS, insbesondere die Abfolge der Saccharid-Einheiten, unterscheidet sich für einzelne Serovare erheblich.
Das H-Antigen bezieht sich auf die bakteriellen Flagellen. Man unterscheidet zwei verschiedene Flagellentypen, die so genannten Phasen 1 und 2, deren Zugänglichkeit teilweise erst durch eine Schwärmplatte nach Sven-Gard verbessert werden muss. Hierbei können einige Serovare nur Phase 1 oder Phase 2 oder beide parallel ausprägen. Innerhalb der Phasen gibt es weitere immunologische Unterscheidungsmöglichkeiten.
Als zusätzliches Antigen bei unklaren Serovaren wird das Vi-Antigen eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein Kapselprotein, von dem ebenfalls je nach Serovar unterschiedliche Varianten vorliegen können (nach POPOFF, 2001).

Während bei dem etablierten Kauffmann-White-Schema noch die Agglutination zwischen Antigen und Antikörper makroskopisch beobachtet wird, ist das Ziel der aktuellen Forschung im Bereich der Serovartypisierung der Einsatz von chip-basierten Arrays, deren Vorteil in der geringen Arbeitsintensität und der schnellen Durchführung innerhalb weniger Stunden liegt. Ein solches System für über einhundert verschiedene Serovare mit fluoreszenzbasierter Auswertung wird z. B. von CAI ET AL. (2005) beschrieben.

Die sensitivsten Detektionssysteme mit gleichzeitiger Serotypisierung von Salmonellen sind PCR-basiert. So beschreiben z. B. MOZOLA (2006) und WAGNER (2006) eine Vielzahl solcher Systeme zur Amplifikation von DNA oder rRNA. Die Detektion einzelner Bakterienzellen in einer Probe können aber auch diese Systeme nicht leisten. Hierfür ist eine Kombination der PCR mit vorgeschalteter Kultivation notwendig (z. B. EYIGOR ET AL., 2002).

Die Nachteile der PCR-basierten Detektion liegen klar bei der hohen technischen und zeitintensiven Umsetzung dieser Systeme und der Vielzahl an notwendigen Arbeitsschritten (Anreicherung, Lyse, Extraktion des Templates, PCR, Gelauswertung). Auch der Einsatz von RT-PCR kann leider nur die letzen beiden Arbeitsschritte verkürzen.
Eine etwas weniger arbeitsintensive Detektionsmethode sind die ELISA-basierten Assays. Aber auch diese benötigen zur Detektion geringer Bakterienzahlen eine Vorinkubation. Einige typische ELISA-basierte Systeme mit verschiedenen Antikörpern werden z. B. von MACIOROWSKI ET AL. (2006) verglichen. Hierbei kann man feststellen, dass höchstens Detektionsgrenzen von 10^4-10^5 cfu pro ml *S. typhimurium* erreichbar sind. Ergebnisse können nach erfolgter Anreicherung oder bei stark kontaminierten Proben in ca. 2-3 h erreicht werden.

Ein großer Nachteil beider Methoden liegt in der Anwendbarkeit von Realproben. Insbesondere die PCR-basierte Detektion wird häufig von Bestandteilen der Probe (z. B. Lebensmittelbestandteile, Zusatzstoffe) gestört. Aber auch in ELISA-Assays können Probenbestandteile zu einer Falschauswertung der Tests führen.
Zur Kompensierung dieses Problems können verschiedene Extraktions- und Aufreinigungsmethoden zur Separation der Salmonellen-Zellen herangezogen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit vielleicht interessanteste Methode ist die magnetische Extraktion. Durch den Einsatz von Magnetpartikeln in Verbindung mit Salmonellen-spezifischen Antikörpern kann mit einem einfachen Magneten eine Extraktion der Kontaminanten aus einer Vielzahl verschiedenster Probenmatrices realisiert werden.
Nach erfolgter Extraktion kann die jeweils bevorzugte Detektionsmethode, z. B. PCR (STRAUB ET AL., 2005) angewendet werden. Auch eine Verringerung des Probenvolumens mit nachfolgender Mikrotiter-Kultivierung und gleichzeitiger Aufkonzentrierung wird durch magnetische Extraktion ermöglicht (TAN UND SHELEF, 1999).
Insbesondere die Kombination von magnetischer Extraktion und anschließender „schneller“ immunologischer Detektion stellt einen sehr interessanten Ansatz im Vergleich zur klassischen Kultivierung dar.
Weitere Detektionsmöglichkeiten zum Nachweis von *S. typhimurium* sind ebenfalls möglich, so beschreiben z. B. OH ET AL. (2004) die Detektion von Salmonellen mit SPR. Der Einsatz von Realproben in der SPR-basierten Detektion ist für einige Matrices wie z. B. Milch ebenfalls möglich (MAZUMDAR ET AL., 2007). Weitere Biosensoren zur Detektion von *S. typhimurium* verwenden z. B. Mikroelektroden (YANG UND LI, 2006),

mikrofluidische Chips (IKEDA ET AL., 2006), Quartzkristall-Mikrowaagen (QCM) wie z. B. GUNTUPALLI ET AL. (2007) und FRET-basierte Glasfasersysteme (Optoden) von KO UND GRANT (2005).

1.8 Übersicht der verwendeten Messtechniken

1.8.1 Oberflächenplasmonresonanz

Die Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR) wird zunehmend als Sensorkomponente in biosensorischen Anwendungen eingesetzt. Insbesondere die Möglichkeit, Affinitätsreaktionen von z. B. interagierenden Biomolekülen in Echtzeit verfolgen zu können, ist hierbei von Interesse (LIEDBERG ET AL., 1983).
Als physikalisches Detektionselement dient eine Oberflächenplasmonwelle. Diese wird erzeugt, sobald p-polarisiertes Licht (d. h. die elektrische Feldkomponente verläuft parallel zur Einfallsebene des Lichtes) auf die Grenzfläche zwischen einem optisch dünnerem und einem mit einer dünnen Metallschicht beschichtetem, optisch dichterem Medium trifft. Die nun frei oszillierenden Elektronen der Metallschicht können mit dem evaneszenten Feld wechselwirken.

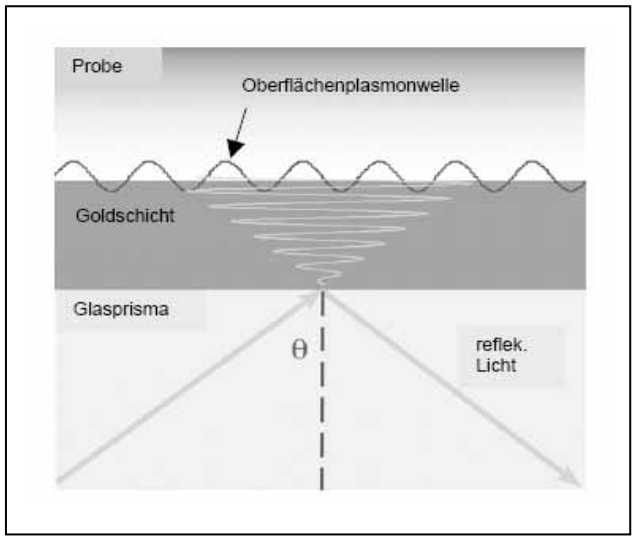


Abbildung 19 Schematische Darstellung einer Oberflächenplasmonwelle. (Bildquelle: HARTMANN, 2004)

Trifft das eingestrahlte Licht in einem speziellen Winkel auf die Grenzschicht (der Resonanzwinkel), so kommt es zur Ausprägung der Oberflächenplasmonresonanz durch eine kollektive Anregung der Elektronen. Hierbei absorbieren diese Licht.
Diese Absorption der Elektronen vermindert die Intensität des reflektierten Lichts; hierdurch ist der Resonanzwinkel aufgrund des Reflektionsminimums leicht zu bestimmen. Der Resonanzwinkel ist abhängig von der zugrunde liegenden Grenzschicht, d. h. auf den jeweiligen Resonanzwinkel des Systems hat die Dicke und Güte der Metallschicht, die Brechungsindices auf beiden Seiten des Metallfilms und die Wellenlänge des eingestrahlten Lichts direkten Einfluss.
Hält man diese Parameter konstant, so können kleinste Änderungen des Brechungsindexes im optisch dünneren Medium, hier die flüssige Probe, erkannt werden. Je näher sich Brechungsindexveränderungen an der Metallschicht vollziehen, z. B. durch spezifische Anlagerung von Biomolekülen an eine biosensitiv modifizierte Metallschicht, desto sensitiver werden diese detektiert. Die Detektion erfolgt als Reaktion auf die Veränderung der Resonanzbedingungen an der Grenzschicht, aufgrund dessen sich der Resonanzwinkel verändert. Diese Winkeländerung ist proportional zum Belegungsgrad der Oberfläche, da eine höhere Anlagerung von Biomolekülen zu einer stärkeren Veränderung des Brechungsindex an der Grenzschicht führt.
In der Oberflächenplasmonresonanz wird also die Winkelverschiebung des Resonanzwinkels, bedingt durch Brechungsindexveränderungen an der sensitiven Metall-Grenzschicht, gemessen.

Der verwendete Metallfilm kann aus Gold, Silber, Kupfer, Titan und Aluminium bestehen. In der Regel wird aber Gold, manchmal Silber verwendet. Gold ist aufgrund seiner chemischen Inertheit einfacher in der Handhabung und zeigt bei gleicher Änderung des Brechungsindexes die größere Resonanzwinkelverschiebung. Im Gegensatz dazu hat Silber ein besseres Signal/Rauschverhältnis und führt durch trennschärfere Intensitätsminima zu einer exakteren Bestimmung des Resonanzwinkels.
Idealerweise führt eine bimetallische Kombination beider Schichten, Silber auf dem Glasprisma und darüber Gold zur Abschirmung gegen Luftsauerstoff und andere Probenbestandteile, zu besseren Messergebnissen (ZYNIO ET AL., 2002). Diese Anordnung hat sich aber noch nicht ausreichend etabliert; meistens wird nach wie vor Gold als Metallschicht verwendet.

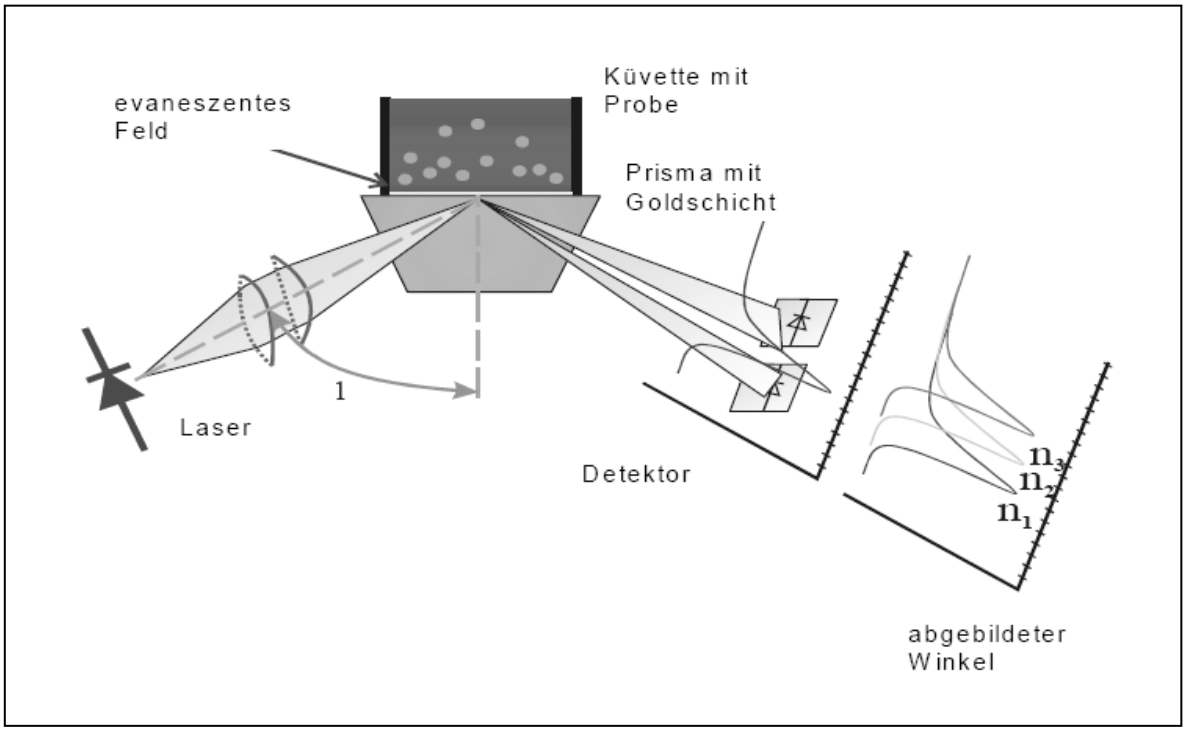


Abbildung 20 Schematische Darstellung der Resonanzwinkeländerung eines SPR-Detektionssystems.

Je nach Brechungsindex der Probe kommt es bei einem bestimmten Einstrahlungswinkel (1) zu einem Intensitätsminimum der reflektierten Strahlung aufgrund der Lichtabsorbtion der Elektronen im evaneszenten Feld. Der somit detektierte Resonanzwinkel (n1) wird durch Veränderungen des Brechungsindex an der sensitiven Grenzschicht verschoben (n2 und n3). Zur Auffindung des Resonanzwinkels wird der Einstrahlungswinkel durch Veränderung der Lichtquellenposition (1) variiert. (HARTMANN, 2004)

Die Vorteile der SPR liegen vor allem in der nicht-invasiven Detektionsmethode. So müssen Probenmoleküle zur Analyse und Detektion nicht markiert werden. Insbesondere komplex strukturierte Biomoleküle können durch eine für andere Detektionsmethoden notwendige Markierung (z. B. Fluoreszenz, Enzym- oder Farbstoffmarkierung) in ihrer spezifischen Struktur nachhaltig negativ verändert werden.

Zusätzlich lässt sich die Interaktion der Probenpartner wie z. B. Antikörper-Antigen Bindung in Echtzeit verfolgen und kinetisch nachvollziehen, wobei bereits während der Messung untypische Fehlanlagerungen aufgrund abweichender Kinetik erkannt werden können (GREEN ET AL., 2000).

Besonders erfolgreich ist die Oberflächenplasmonresonanz bei der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen (Biomolekulare Interaktionanalyse, BIA), wozu auch die Antikörper-Antigen-Interaktion gehört. Die SPR erlaubt hierbei auch eine diagnostische Anwendung, z. B. zur Detektion von Infektionen oder der Bestimmung von Blutmarkern (GAMBARI, 2001).
Auch die Interaktion zwischen Proteinen und DNA kann beobachtet werden (HOMOLA ET AL., 1999). Die hierbei auftretenden Probleme mit eventuell zu kleinen und somit nur schwer detektierbaren Molekülen (<500 Da) können durch kompetitive Messanordnungen oder Sandwich-Assays kompensiert werden (KEUSGEN, 2002).

Das in dieser Arbeit verwendete Plasmonic® SPR der Firma Hofmann Sensor Systeme, Wallenfels, wird Kap.2.18 Oberflächenplasmonresonanz (SPR), näher erläutert.

1.8.2 Magnetic Beads

Der Begriff Magnetic Beads beschreibt kleine Magnetpartikel von ca. 20 nm - 10 µm im Durchmesser. Diese werden als polydisperse Lösung eingesetzt.
Der Aufbau der Magnetpartikel hängt von der Herstellungsmethode ab. In der Regel wird paramagnetisches Magnetit (Fe_3O_4) in einem Polymer eingeschlossen. Die Oberfläche des Polymers kann dann über weitere Modifikationen als Immobilisierungsfläche z. B. für Antikörper eingesetzt werden.

Magnetit (Fe_3O_4) besteht aus jeweils einem zweiwertigen und zwei dreiwertigen Eisenionen in einem kubischen Kristallgitter. Das normalerweise ferrimagnetische Material verhält sich bei kleinen Kristallgrößen unter 30 nm superparamagnetisch. Diese Form des Paramagnetismus bedeutet, dass ein Metall durch ein magnetisches Feld selbst magnetisiert werden kann. Nach Entfernen des Magneten geht die Magnetisierung sofort wieder verloren.
Das Gegenteil hiervon ist z. B. Maghemit, (Fe_2O_3), welches rein ferrimagnetisch und somit nachhaltig magnetisierbar ist. Nach Entfernen des Magnetfeldes weist das Maghemit für längere Zeit magnetische Eigenschaften auf, die Stärke und Dauer der Magnetisierung hängt von den Eigenschaften des eingesetzten Magneten ab. Dieses Phänomen bezeichnet man als Hysterese (VOGEL, 1995).

Im Rahmen des Einsatzes von Magnetit in Magnetic Beads wird darauf geachtet, die superparamagnetischen Eigenschaften des Materials zu erhalten. Die Korngröße der einzelnen Magnetitpartikel darf daher 30 nm nicht überschreiten. Die endgültige Größe des Magnetic Beads von mehr als 30 nm wird durch Verbindung mehrerer Magnetitpartikel in einer schützenden Polymerschicht erreicht.

Die typische Herstellungsform von Magnetic Beads beruht auf einem Emulsionsverfahren. Mangnetit wird aus gelösten Eisensalzen präzipiert und dann mithilfe einer Emulsion in tröpfchenförmigen Polymerpartikeln eingehüllt. Hierbei werden die Ausgangsstoffe des Polymers in der organischen Phase der Emulsion mit den Magnetitpartikeln vermischt. Anschließend wird die Polymerisierung ausgelöst, die sich über das gesamte Magnetpartikel fortsetzt. Über den Grad der Emulsion und die Viskosität der eingesetzten Stoffe kann die Tröpfchengröße und somit die finale Partikelgröße gesteuert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Magnetic Beads stammen von der chemagen AG und wurden mit dem Polymer Polyvinylalkohol (PVA) in einer Speiseöl-Emulsion hergestellt (MÜLLER-SCHULTE UND BRUNNER, 2000).

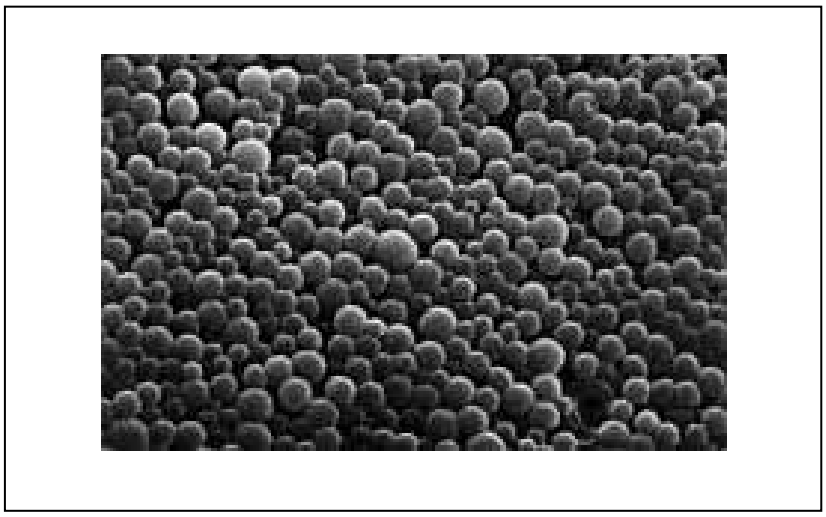


Abbildung 21 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von Magnetic Beads. (Bildquelle: chemagen AG)

Die Polymeroberfläche der Magnetic Beads stellt neben ihrer Magnetit-schützenden Funktion auch eine Immobilisierungsplatform für verschiedenste Immobilisierungstechniken dar. Die am häufigsten anzutreffenden Oberflächenfunktionalisierungen sind Beschichtungen mit Streptavidin zur Kopplung von biotinylierten Biomolekülen wie z. B. Antikörpern. Ebenfalls häufig verbreitet sind oberflächengebundene Oligo-Nukleotide. Diese kurzen DNA-Stränge können zur

Extraktion von genomischer DNA oder mit poly-Thymin Funktion zur Extraktion von mRNA mit Poly-Adenin-Tail genutzt werden.

Die Extraktion von Molekülen aus einer Lösung oder Probe mithilfe von Magnetic Beads erfolgt über die magnetische Extraktion. Hierbei wird an die Außenwand oder in das Reaktionsgefäß ein Magnet positioniert. Die Magnetic Beads sammeln sich aufgrund der magnetischen Anziehung an diesem Magneten. Das zu extrahierende Molekül bleibt über die jeweils sensitive Gruppe an das Magnetic Bead gebunden und kann somit mitextrahiert werden (OLSVIK ET AL., 1994). Auch das Anreichern in einem bestimmten Punkt des Reaktionsgefäßes und anschließendes Abtrennen der umgebenden Probenlösung sowie nachfolgendes Waschen des Reaktionsgefäßes und der Magnetic Beads ist möglich. Somit können Magnetic Beads also zur Abtrennung, Reinigung und Aufkonzentrierung von Analyten eingesetzt werden (SAFARIK UND SAFARIKOVA, 2004). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch das definierte Bewegen von Magnetic Beads mit gebundenem Analyten in Kapillaren und fluidischen Anwendungen. Dies wird als magnetische Manipulation der Partikel bezeichnet (BREZSKA ET AL., 2004).
Verschiedene Autoren haben auch die Anwendbarkeit der vorteilhaften magnetischen Extraktion in Verbindung mit unterschiedlichen Detektionssystemen in Form von Bioassays beschrieben. Einen Überblick über die Nutzung von PCR-, Elektoden- und ELISA-basierter Detektion mit Magnetic Beads geben HAUKANES UND KVAM (1993).

Letztendlich eignen sich die Magnetic Beads nicht nur für magnetische Extraktionen von Analyten. Aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften ist auch ein Einsatz als detektierbares Molekül bzw. Label denkbar. Hierbei ergeben sich außerdem ablaufspezifische Vorteile durch Kombination von magnetischer Extraktion und anschließender magnetischer Detektion.

1.8.3 Magnetische Detektion

Die Idee der magnetischen Detektion wird seit mehreren Jahrzehnten bereits regelmäßig eingesetzt. Ein typisches Beispiel ist die Werkstoff- und Bauteilprüfung.
Die Detektion von superparamagnetischen Teilchen wie z. B. Magnetic Beads in biosensorischen Anwendungen ist erst in den letzten Jahren aufgekommen. Magnetische Detektion solcher Partikel kann allerdings mit verschiedenen Messtechniken ermöglicht werden. Hierbei gibt es große Unterschiede bezüglich Sensitivität und Gerätekomplexität.

Auch die Herstellungs- und Messkosten können für die verschiedenen Detektionstechniken weit auseinander liegen. Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Detektionstechniken, die Suszeptometrie und die Relaxometrie.

Bei der Suszeptometrie wird die Probe mit einer definierten Frequenz in einem magnetischen Feld angeregt. Die magnetische Reaktion der Probenbestandteile wird dann z. B. über eine supraleitende Quanteninterferenzeinheit (SQUID) bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine extrem sensitive Methode; bereits kleinste Partikel superparamagnetischen Materials können detektiert werden. Die Funktionsweise eines SQUID basiert auf dem Effekt der Flussquantisierung in supraleitenden Ringen und dem Josephson-Effekt.

Ein SQUID besteht aus einem Ring aus supraleitendem Material. Dieses wird an einer oder mehreren Stellen von einem normal leitendem oder sogar elektrisch isolierendem Material unterbrochen. Diese Unterbrechung ist hierbei jedoch so fein, dass Elektronenpaare des Supraleiters durch die Kontakte tunneln können. Ein solcher Tunnelkontakt wird als Josephson-Kontakt bezeichnet.

Ändert sich das äußere Magnetfeld, so wird im Ring ein elektrischer Kreisstrom angeregt, der groß genug ist, um den magnetischen Fluss im supraleitenden Ring zu erhöhen oder zu verringern. Diese magnetfeldabhängige Änderung des Stromes lässt sich durch den Josephson-Effekt messen. Hierzu wird der supraleitende Ring elektrisch angesteuert. Bei einem Strom, der die kritische Stromstärke der Josephson-Kontakte übersteigt, fällt am SQUID eine messbare elektrische Spannung ab. Diese ist abhängig von Änderungen des detektierten Magnetfeldes (CLARKE UND BRAGINSKI, 2004).

Allerdings fehlt es der Suszeptometrie allgemein an Selektivität, da sehr hohe Hintergrundsignale von anderen paramagetischen Materialien wie z. B. Probenhalter, Messküvette oder sogar Wasser gemessen werden. Bei Einsatz eines SQUID muss die gesamte Messung in einem komplett abgeschirmten Raum erfolgen. Zur Erreichung der höchstmöglichen Auflösung muss der SQUID zusätzlich mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden, es handelt sich also um ein nicht-transportables System. Die Sensitivität der SQUID-basierten Suszeptometrie ist aber hervorragend. So kann dieses Sytem nicht nur zur Detektion von einzelnen Magnetpartikeln genutzt werden, sondern auch zur Detektion von Eisen-Akkumulationen in der Leber bei Thalassemie (NIELSEN ET AL., 2000).

Die Messtechnik der Suszeptometrie kann außer mit SQUIDs auch mit anderen Detektionssystemen genutzt werden. Hier ist vor allem der „Riesen-Magnetwiderstand“ zu

nennen. Beim Giant-Magneto-Resistant (GMR) werden Chips verwendetet, die aus zwei ferromagnetischen Schichten mit einem innen liegenden, nicht ferromagnetischen Spacer bestehen. Wird diese Struktur in Kontakt zu einem Magnetpartikel gebracht, so lässt sich ein starker Anstieg des Chip-Widerstandes feststellen. GMR-basierte Chips können einfach und in großer Stückzahl hergestellt werden. Die GMR-Messtechnik ist bereits gut etabliert und wird z. B. in Leseköpfen von Festplatten eingesetzt. Für den Einsatz in Bioassays nachteilig ist die Problematik der Probenpositionierung. Die zu detektierenden Partikel müssen immer in der gleichen, sehr nahen Position am GMR-Sensor vermessen werden. GMR basierte Bioassays werden z. B. von MEGENS UND PRINS (2005), SCHOTTER ET AL. (2004) und DE BOER ET AL. (2006) beschrieben. Ihre Sensitivität ist geringer als SQUID-basierte Technologien, aber für die meisten biosensorischen Anwendungen ausreichend.

Eine weitere Variante der Suszeptometrie ist der Einsatz von Hall-Effekt basierten Sensoren. Der Hall-Effekt wurde erstmals von E. H. HALL (1879) beschrieben. Hierfür wird ein Hall-Element, meistens ein stromdurchflossener elektrischer Leiter, in einem Magnetfeld positioniert. Das Magnetfeld wirkt auf die wandernden Elektronen mit der so genannten Lorentzkraft ein. Hierdurch kommt es in dem Hall-Element zu einer Anreicherung der Elektronen im Bereich des Hall-Elements, der sich senkrecht zur Stromflussrichtung befindet. Durch die Anreicherung der Elektronen in einem Bereich des Hall-Elementes kommt es in einem anderen Bereich zu einer Verarmung. Man erreicht also eine Ladungstrennung, analog zum Prinzip des Kondensators. Wie bei einem Kondensator kann auch am Hall-Element eine Spannung gemessen werden, die so genannte Hall-Spannung (YOSHIOKA, 2002). Diese reagiert sehr empfindlich auf Veränderungen des Magnetfeldes. Durch Positionierung einer Probe mit Magnetpartikeln in dem Hall-Magnetfeld kommt es zu einer Veränderung des Magnetfeldes, was wiederum über den Hall-Effekt zu einer Veränderung der Hall-Spannung führt. Hall-Effekt-basierte Bioassays wurden von EJSING ET AL., (2004) und SANDHU ET AL., (2006) beschrieben.
Als letzte Möglichkeit der Suszeptometrie soll hier die Induktionspulentechnologie vorgestellt werden. Hierbei handelt es sich um eine Spule mit einem gewickeltem elektrischen Leiter, meistens Kupferdraht. Legt man an die Spule einen Stromfluss an, so zeigt sich ein induktiver magnetischer Effekt der Spule. Im Gegensatz dazu kann die ruhende Spule durch Magnetfelder beeinflusst werden; in diesem Fall tritt eine elektromagnetische Induktion auf. Dies bedeutet, das externe Magnetfeld erzeugt eine Spannung, welche nun detektiert werden kann. Befinden sich also Magnetpartikel in einer

Probe, lässt sich über die Induktionsspule eine Spannung detektieren. Diese Methode ist nicht besonders sensitiv. Das Erreichen einer zufrieden stellenden Spulengüte ist ebenfalls sehr kompliziert. Zusätzlich muss die Probe eine große räumliche Nähe zur Spule bzw. in der Spule aufweisen. Bioassays basierend auf Suszeptometrie mit Induktionsspulen wurden z. B. von KRIZ ET AL. (1998) und KRIZ ET AL. (2005), sowie von LU ET AL. (2005) realisiert.

Die Relaxometrie ermöglicht im Gegensatz zur Suszeptometrie eine Unterscheidung zwischen gebundenen und beweglichen Partikeln, also z. B. Magnetic Beads immobilisiert und in Lösung. Das Messprinzip beruht auf der Relaxation des Probenmaterials nach Anregung im magnetischen Feld. Wird das Magnetfeld abgeschaltet, verschwindet die Magnetisierung der gebundenen Magnetpartikel gemäß der Néel-Relaxation im Bereich von Millisekunden; die Entmagnetisierung der freien Partikel folgt der Brownschen Relaxation und wird nach mehreren Mikrosekunden erreicht. Die Detektion dieser magnetischen Relaxationssignale solch kleiner Magnetpartikel können auch hier am besten mithilfe eines SQUID-Sensors detektiert werden. Die Nachteile des SQUIDs in Form der sehr komplexen Messanordnung und hohen Produktions- sowie Messkosten sind analog zur Suszeptometrie. SQUID-basierte Sensoren mit Relaxometrie wurden z. B. von MATZ ET AL. (1998) und CHEMLA ET AL. (2000) vorgestellt.

Ebenfalls möglich ist die Anwendung der Relaxometrie mit den bereits beschrieben Induktionsspulen. Hierbei muss aber beachtet werden, dass einfache Induktionsspulen per se nicht besonders sensitiv sind. Die zu detektierenden Signale bei der Relaxometrie sind aber eher niedrig. Somit ist eine sehr gute Abstimmung des Systems in Verbindung mit einer elektronischen Signalamplifikation notwendig. Ein solches System wurde z. B. von ASTALAN ET AL. (2004) vorgestellt.

Eine neue Methode zur Detektion von Magnetpartikeln in Bioassays ist die so genannte Frequenzmischung. Hierbei wird eine magnetische Anregung bei zwei verschiedenen Frequenzen mit Induktionsspulen angewendet. Die magnetischen Signale der angeregten Magnetpartikel werden auf einer dritten Frequenz, die sich als harmonische Mischung der beiden Anregungsfrequenzen darstellt, mit zusätzlichen Induktionsspulen detektiert. Aufgrund des Sensitivitätsnachteils von Induktionspulen zur Detektion wird auch bei diesem System mit elektronischer Signalamplifikation gearbeitet. Das Verfahren der

Frequenzmischung für Bioassays wurde 2003 von KRAUSE ET AL. patentiert und wird in Kap. 2.19 Magnetische Detektion mit Frequenzmischung näher beschrieben.

1.9 Zielsetzung

Aufbauend auf der Technik der magnetischen Detektion mit Frequenzmischung (s.o.) war die Charakterisierung und Evaluierung dieser neuen Detektionstechnik notwendig. Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung von Modellapplikationen für die magnetische Detektion. Hierbei wurde der von Hans-Joachim Krause (FZ Jülich, 2003) entwickelte Magnet Reader eingesetzt.

Als Träger bzw. Festphasensystem zur Verwendung in der magnetischen Detektionseinheit sollte das ABICAP®-System der Firma Senova verwendet werden. Dieses besteht aus Polyethylen-Sinterkörpern und kleinen Chromatographiesäulen, in denen die Sinterkörper als Filter eingesetzt werden. An den PE-Sinterkörpern können Biomoleküle spezifisch immobilisiert werden. Durch Immobilisierung von z. B. Antikörpern können die entsprechenden Antigene aus einer über die Säule gegebenen Probenlösung extrahiert und angereichert werden. Eine nachfolgende, zusätzliche Markierung ist ebenfalls möglich. Man bezeichnet dieses Verfahren als Immunofiltration. Entsprechende Arbeiten mit diesem System wurden innerhalb der Arbeitsgruppe von Inke DEGENER (2004) und Markus HARTMANN (2004) durchgeführt.

Die Charakterisierung der immunologischen Assay-Komponente sollte zum besseren Verständnis der Interaktion mit Oberflächenplasmonresonanz (SPR) untersucht werden. Entsprechende Vorarbeiten wurden von Markus HARTMANN (2004) erarbeitet. Die SPR ist als sensitive optische Detektionsmethode ohne zusätzliche Markierungsnotwendigkeit der Biomoleküle hierfür geeignet.

Bei der Entwicklung von Modellapplikationen für die magnetische Detektion sollte neben der immunologischen Komponente der Detektion auch die Eigenschaften der Magnetic Beads charakterisiert und auf eine Detektion hin getestet werden. Als Entwicklungspartner stand hierfür die chemagen AG bereit. Magnetic Beads wurden bisher nicht in Kombination mit dem ABICAP®-System verwendet.

Insbesondere die magnetische Extrahierbarkeit der Magnetic Beads mithilfe eines Magneten ist für die Detektion von Analyten aus komplexen Probenmatrices besonders interessant. Diese Eigenschaft kann bei einem Assay mit magnetischer Detektion berücksichtig und integriert werden.

Die vorliegende Arbeit lässt sich daher in vier verschiedene Bereiche unterteilen:

- Entwicklung und Vergleich verschiedener Immobilisierungstechniken für Antikörper an Polyethylen-Sinterkörpern im Bezug auf magnetische Detektion. Außerdem Modifikation der Polytehylen-Oberfläche um zusätzliche Eigenschaften, z. B. der Bakterienaffinität. Zusätzlich soll eine analoge Charakterisierung von Immobilisierungsstrategien für Antikörper auf Polystyrol durchgeführt werden.

- Entwicklung und Charakterisierung von Modellapplikationen auf Oberflächen-plasmonresonanz (SPR)-Basis. Ziel war die Testung der immunologischen Assaykomponente und der Vergleich zwischen SPR-basierter und magnetischer Detektion.

- Aufbau von Modellapplikation mit magnetischer Detektion für verschiedene Bakterien (*Yersinia pestis, Mycobacetrium avium subsp. paratuberculosis, Francisella tularensis, Clostridium botulinum, Salmonella typhimurium*) und das humane C-reaktive Protein (CRP) als typischer Blutwert. Hierbei sollte neben einer möglichst sensitiven Detektion auch die zusätzliche Eigenschaft der Magnetpartikel, die magnetische Extrahierbarkeit, berücksichtigt werden.

- Charakterisierung verschiedener Detektionssysteme basierend auf magnetischer Detektion. Hierzu wurden verschiedene Entwicklungsstufen des Magnet Readers getestet und verglichen. Außerdem sollte eine Verwendung der magnetischen Detektionstechnik in Verbindung mit einem fluidischen Probentransport getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterial und Software

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tab. 1 aufgeführten Geräte verwendet. Weitere Geräte und Zubehör im Rahmen einer allgemeinen Laborauststattung sind nicht gesondert aufgeführt.

Tabelle 1 Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterial und Software

Gerät / Software	Typ	Hersteller
Geräte und Verbrauchsmaterial		
ABICAP® Arbeitsstation	Standard	SENOVA (Jena)
ABICAP® Minisäulen	Standard	SENOVA (Jena)
ABICAP® Polyethylensinterkörper	120.C, Porendurchmesser 100 µm	SENOVA (Jena)
ABICAP® Polyethylensinterkörper	180.C, Porendurchmesser 50 µm	SENOVA (Jena)
ABICAP® Polyethylensinterkörper	Porendurchmesser 5 µm	SENOVA (Jena)
Dialyse	Tube-O-Dialyzer (MWCO 1000 Da)	Geno Technology (St. Louis, MO, USA)
Elektrophorese-Apparatur		Thermo (Waltham, MA, USA)
FPLC (inkl. Säule)	Ekta Prime	GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
	Ni-NTA-Säule	GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)
Heizblock	HTM 130	HLC (Bovenden)
Inkubatoren	Innova 4200	New Brunswick (Edison, NJ, USA)
	Thermo Class 100	Thermo (Waltham, MA, USA)
Magnet-Reader	Prototyp	FZ Jülich (Dr. H.-J. Krause)
	Modifizierter Sensor	FZ Jülich (Dr. H.-J. Krause)
MTP-Photometer	Multiscan EX	Thermo (Waltham, MA, USA)
Oberflächenplasmonresonanz-Spektrometer	Plasmonic	HSS Systeme (Wallenfels)
Pumpe	Abimed Miniplus 3	Gilson (Middleton, WI, USA)
Schüttler	Titramax 101	Heidolph (Schwabach)
Sonotroden (inkl. Zubehör)	Labsonic 1510	B.Braun (Melsungen)
Sterilfilter	0,22 µm	Sartorius Vivascienes (Hannover)
Ultrafiltration	15 kDa Spintubes Vivaspin	Sartorius Vivascience (Hannover)
UV-Lampe		Heraeus (Hanau)
Waage	CP225D-OCE	Sartorius (Hannover)
Zentrifugen	Avanti J-25	Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA)
	Multifuge 3-SR	Heraeus (Hanau)
	Biofuge Pico	Heraeus (Hanau)
Software		
PyMOL	Graphische Moleküldarstellung	DeLano Scientific (San Francisco, CA, USA)

2.2 Chemikalien und Reaktionskits

Allgemein gebräuchliche Chemikalien wurden von der Firma FLUKA (München) und Sigma (München) mit einem Mindestreinheitsgrad von „p. a.“ bezogen. Spezielle und anderweitig bezogene Chemikalien und Reaktionskits sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tabelle 2 Chemikalien und Reaktionskits

Chemikalien und Reaktionskits	Hersteller
Agar	Acros Organics (Geel, Belgien)
Agarose	AppliChem (Darmstadt)
Albumin (BSA)	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Carl Roth (Karlsruhe)
Aminopropyltriethoxysilan (APTES)	Fluka (München)
Bernsteinsäureanhydrid	Fluka (München)
Biotin-NHS	Fluka (München)
Biotin-(PEO_3)-Amin	Pierce (Rockford, IL, USA)
Bronidox	Sigma (München)
Caseinpuffer	SDT (Baesweiler)
Morpholino-Ethan-Sulfonsäure (MES)	Sigma (München)
N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)	Fluka (München)
N-3-Dimethylaminopropyl-N'-ethylcarbodiimid (EDC)	Fluka (München)
Ethanolamin	Fluka (München)
4-Fluoro-3-Nitrophenyl-azid (FNPA)	MP Biomedicals (Eschwege)
Glutardialdehyd (25 %)	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	AppliChem (Darmstadt)
Imidazol	Acros Organics (Geel, Belgien)
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	Acros Organics (Geel, Belgien)
Octadecyltrimethoxysilan	Fluka (München)
Pepton (tryptisch verdaut)	Acros Organics (Geel, Belgien)
Streptavidin	ProZyme (San Leandros, USA)
Hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoate (Sulfo-HSAB)	Pierce (Rockford, IL, USA)
Reaktionskits	
MiniPlasmid Kit	Eppendorf (Hamburg)

2.3 Magnetic Beads

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Extraktion von Analyten und speziell zur magnetischen Detektion magnetische Partikel, sogenannte Magnetic Beads, verwendet. Tabelle 3 gibt eine Übersicht der eingesetzten Partikel.

Tabelle 3 Magnetic Beads

Bezeichnung	Eigenschaften, Durchmesser	Quelle
M-PVA SAV 1	Streptavidinoberfläche, 0,5-1 µm	Chemagen (Baesweiler)
M-PVA SAV 1 NCO	Streptavidinoberfläche mit spezieller Isothiocyanatkopplung, 0,5-1 µm	
M-PVA SAV 1 COOH	Streptavidinoberfläche mit spezieller Carboxykopplung, 0,5-1 µm	
M-PVA SAV X „small"	Streptavidinoberfläche, 100 nm	
M-PVA SAV X „very small"	Streptavidinoberfläche, 10 nm	
M-PVA AK1	Reaktive Oberfläche, 0,5-1 µm	
M-PVA SAV 2	Streptavidinoberfläche, 2-5 µm	
M-PVA AK2	Reaktive Oberfläche, 2-5 µm	
SA-SBM 2	Streptavidinoberfläche, 1 µm	SENOVA (Jena)
M-BMS-100	Streptavidinoberfläche, 100 nm	Merck, Estapor Microspheres (Fontenay sous Bois, France)
BE-M 08/0.2	Streptavidinoberfläche, 200 nm	
BE-M 08/0.3	Streptavidinoberfläche, 300 nm	
BE-M 08/0.86	Streptavidinoberfläche, 860 nm	
BE-M 08/0.86 Rec	Streptavidinoberfläche, 860 nm, Streptavidin rekombinant modifiziert	
BE-M 08/2.6	Streptavidinoberfläche, 2,6 µm	

Dynal M-270	Streptavidinoberfläche (leicht hydrophil), 2,6 µm	Invitrogen Dynal AS (Oslo, Norwegen)
Dynal M-280	Streptavidinoberfläche (leicht hydrohob), 2,6 µm	
Dynal C1	Streptavidinoberfläche (leicht hydrophil), 1 µm	
Dynal T1	Streptavidinoberfläche (leicht hydrohob), 1 µm	
MagSI 0.6	Streptavidinoberfläche, 0,6 µm	Magnamedics (Maastricht, Niederlande)
MagSI 1.0	Streptavidinoberfläche, 1 µm	
SiMAG 1.0	Streptavidinoberfläche, 1 µm	Chemicell (Berlin)
fluidMAG 0.2	Streptavidinoberfläche, 0,2 µm	
MGSA	Streptavidinoberfläche, 0,7 µm	Seradyn (Indianapolis, USA)
dsMGSA	Streptavidinoberfläche, 1,3 µm	

2.4 Antikörper und Antigene

Die in immunologischen Detektionsverfahren Antikörper und Antigene bzw. Analyten wurden größtenteils von institutionellen und industriellen Projektpartnern bezogen. Für die Bereitstellung dieser Biochemikalien möchte ich mich bei Herrn Prof. Singh (Lionex / Helmholtz-Institut für Infektionsforschung) und Herrn Dr. Miethe (Senova) herzlich bedanken.

Tabelle 4 Antikörper und Antigene

Bezeichnung	Eigenschaften	Quelle
Francisella tularensis LPS	Lipopolysaccharid	SENOVA (Jena)
anti-FT	IgG, monoklonal, gerichtet gegen *Francisella tularensis* LPS	
Yersinia pestis YPF1	Kapselprotein von *Yersinia pestis*	
Clostridium botulinum Toxoid B	Toxoid B von *Clostridium botulinum*	
anti-CB	Fab-Fragment, polyklonal, gerichtet gegen *Clostridium botulinum* Toxoid B	
Mycobacterium paratuberculosis LAM	Lipoarabinomannan	Lionex / GBF (Braunschweig)
anti-LAM	IgM, monoklonal, gerichtet gegen LAM	
anti-YP	IgG, monoklonal, gerichtet gegen YPF1	
C-reaktives Protein (CRP)	Humanes Serumprotein, pur	BioTrend (Köln)
anti-CRP C2	IgG, monoklonal, Klon C2, gerichtet gegen humanes CRP	
anti-CRP C6	IgG, monoklonal, Klon C6, gerichtet gegen humanes CRP	
Salmonella typhimurium LPS	Lipopolysaccharid	Sigma (München)
anti-ST	IgG, polyklonal, gerichtet gegen *Salmonella typhimurium* LPS	Capricorn (Portland, ME, USA)
anti-MT	IgG, polyklonal, gerichtet gegen *Mycobacterium tuberculosis*, Kreuzpsezifität gegen *Mycobacterium paratuberculosis* LAM	Acris (Herford)
anti-CBB C18	IgG, monoklonal, gerichtet gegen *Clostridium botulinum* Toxoid B	Hytest Ltd. (Finnland)
anti-CBB C27	IgG, monoklonal, gerichtet gegen *Clostridium botulinum* Toxoid B	

2.5 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden je nach Anwendung bei 121°C und 1 bar Überdruck für 20 Minuten autoklaviert oder sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,22 µm Porenweite). Bei wässrigen Puffern und Lösungen wurde immer Millipore®-Wasser oder bidest. Wasser verwendet. Zusätzlich wurden alle verwendeten Puffer mit 0,5 % 5-Bromo-5-Nitro-1,3 Dioxan (Bronidox) konserviert.

2.5.1 Reaktionspuffer

Tabelle 5 Reaktionspuffer

Pufferbestandteile	Konzentration
Phosphate buffered saline (PBS)	
NaCl	120 mM
Natriumhydrogenphosphat pH 7,3	30 mM
MES-Puffer	100 mM
Phosphatpuffer	
Natriumhydrogenphosphat pH 6,0	100 mM
Carbonat-Puffer	
Natrium-(hydrogen)-carbonat pH 8,3	100 mM
Natrium-(hydrogen)-carbonat pH 9,5	100 mM

2.5.2 Herstellung kompetenter Zellen

Um hitzeschock-kompetente Zellen herzustellen, wurden folgende in Tab. 6 angegebenen Lösungen verwendet.

Tabelle 6 Lösungen für die Herstellung kompetenter Zellen

Lösungsbestandteile	Konzentration
TfBI-Lösung pH 5,8	
Calciumacetat	30 mM
$MnCl_2$	50 mM
RbCl	100 mM
$CaCl_2$ x 2 H_20	10 mM
Glycerin	10 mM
Der entsprechende pH-Wert wurde mit Essigsäure eingestellt.	
TfBII-Lösung pH 6,8	
RbCL	10 mM
$CaCl_2$ x 2 H_20	75 mM
MOPS	10 mM
Glycerin	15 % (v/v)
Der entsprechende pH-Wert wurde mit NaOH eingestellt.	

2.5.3 Färbe- und Fixierlösungen

Zur Färbung und Fixierung von Proteingelen (SDS-PAGE) wurden die in Tab. 7 aufgelisteten Lösungen angewendet.

Tabelle 7 Lösungen zum Färben und Fixieren von Polyacrylamid-Gelen

Lösungsbestandteile	Konzentration
Coomassie-Färbelösung	
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,2 % (w/v)
Eisessig	10 % (v/v)
Methanol	30 % (v/v)
Coomassie-Fixierlösung	
Eisessig	10 % (v/v)
Methanol	30 % (v/v)

2.5.6 FPLC

In Tab. 8 sind die Puffer aufgeführt, die für die Proteinaufreinigung und Proteinanalysen mit der FPLC-Einheit benutzt worden.

Tabelle 8 Puffer für FPLC-Anwendungen

Pufferbestandteile	Konzentration
Bindepuffer (Ni-NTA-Säule) pH 8,0	
Kaliumhydrogenphosphat	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
Elutionspuffer (Ni-NTA-Säule) pH 6,0	
Kaliumhydrogenphosphat	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM

2.5.7 Zellaufschluss und Waschpuffer

Geerntete Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen. Für den Zellaufschluss zur Gewinnung intrazellulärer Proteine kam ein spezieller Lysepuffer zum Einsatz.

Tabelle 9 Lysepuffer

Pufferbestandteile	Konzentration
Lysepuffer pH 8,0 (analog zu Bindepuffer der FPLC, Tab. 8)	
Kaliumhydrogenphosphat	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
Lysozym	0,3 % (w/v)

2.6 Medien

Im Rahmen des Medienscreenings sind zur Anzucht der *E. coli*-Stämme verschiedene Kulturmedien verwendet worden. Zugrundegelegt wurden die Medien „Luria Bertani (LB)“ und „Terrific broth (TFB)“.
Diese Mediengrundtypen wurden durch Zugabe von verschiedenen C-Quellen variiert. Hierzu setzt man dem jeweiligen Medium Glycerin- oder Glucoselösung zu, sodass eine Endkonzentration von 2 % der jeweiligen C-Quelle erreicht wird.

Zur Sterilisation wurden die Medien bei 121°C und 1 bar Überdruck für 20 Minuten autoklaviert. Pufferkomponenten, Antibiotika und IPTG (beide siehe Tab. 11) sind je nach Bedarf sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,22 µm Porenweite) und steril zugegeben worden. Festmedien wurden mit LB-Medium unter Zugabe von 15 g/L Agar hergestellt. Das als Selektionsmarker benötigte Antibiotikum (siehe Tab. 11) wurden nach dem Autoklavieren über einen Sterilfilter zugegeben.

Das Induktionsmittel IPTG wird in einer Konzentration von 0,5 mM zu einem geeigneten Zeitpunkt über einen Sterilfilter dem bewachsenen Kulturmedium zugeführt.

Tabelle 10 Kulturmedien

Medienbestandteile	Konzentration
Lauri Bertani-Medium (LB)	
Trypton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
Agar (für Festmedien)	1,5 % (w/v)
Terrific Broth (TFB)	
Trypton	1,2 % (w/v)
Hefeextrakt	2,4 % (w/v)
Kaliumhydrogenphosphatpuffer pH 7,3	50 mM

Tabelle 11 Antibiotika und IPTG

Lösungsbestandteile	Konzentration	Lösungsmittel
Antibiotikum (Stammlösung)		
Ampicillin	2,5 % (w/v)	Entionisiertes Wasser
IPTG (Stammlösung)	0,5 M	Entionisiertes Wasser

2.7 Enzyme und Standards

In dieser Arbeit wurden SDS-PAGE Größenstandards der Firma MBI FERMENTAS (St.Leon-Rot) und der Firma ROTH (Karlsruhe) verwendet. Weiterhin wurde Lysozym (76344 $U \cdot mg^{-1}$) der Firma FLUKA (München) zum bakteriellen Zellaufschluss verwendet.

2.8 Gene und Plasmide

Tabelle 12 **Verwendete Plasmide**

Plasmid	Merkmale	Referenz / Quelle
pWK407	Amp^R; lac-Promotor. Expressionsvektor für verkürzte Version eines Bindungsproteins des Phagen T22 (anti-Salmonella TSP) mit angefügten His_6-Tag	Wolfgang Klein

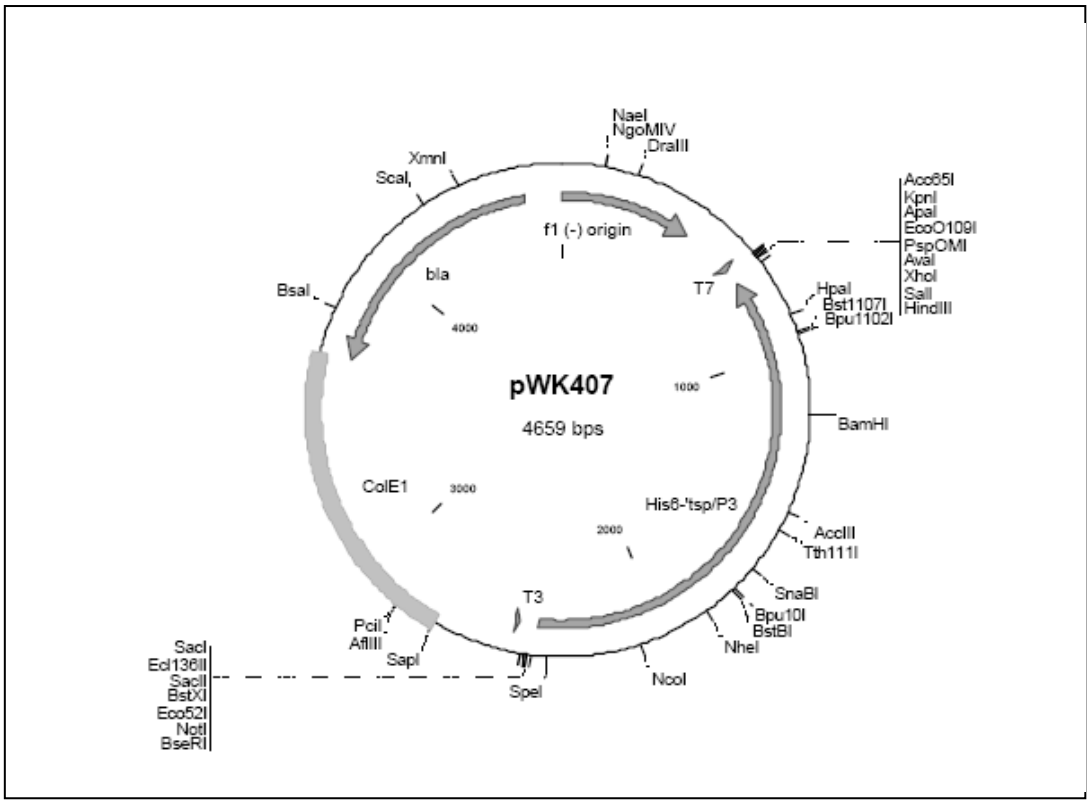


Abbildung 22 **Restriktionskarte für Plasmid pWK407**

2.9 Organismen

Für diese Arbeit wurde ein rekombinantes Bindungsprotein (tail spike protein, TSP) des *Salmonella typhimurium*-spezifischen Phagen P22 verwendet. Die Plasmidführung und Expression erfolgte in *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Tabelle 13 Verwendete Organismen

Stamm	Bezeichnung	Merkmale	Quelle / Referenz
Escherichia coli	BL21 (DE3)	F^-, *omp*T, *hsd*S_B ($r_B^-m_B^-$), gal, dcm, (DE3)	Novagen (über Merck, Darmstadt)
Salmonella typhimurium	CCUG 11732	Thermisch inaktiviert	Prof. Kämpfer (Universität Gießen)

2.10 Herstellung biosensitiver Schichten

2.10.1 Vorbereitung der Träger

Goldprismen

Zu beschichtene Goldprismen für die SPR wurden zuerst optisch auf Beschädigungen der Oberfläche untersucht und für 5-10 Minuten in Aceton (10 ml/Goldprisma) gesäubert. Die eigentliche Reinigung der Oberfläche erfolgte für 20 Minuten in einer Mischung aus 0,1 M Kaliumhydroxid und 30%igem Wasserstoffperoxid (v/v 1:1) bei 60-65°C (10 ml/Goldprisma). Im Anschluss wurde gründlich mit Millipore®-Wasser gespült, dann mit Methanol, gefolgt von Toluol (jeweils 3-mal mit je 20 ml Volumen). Die Goldprismen wurden ungetrocknet zur Beschichtung eingesetzt.

Polyethylensinterkörper

Die Polyethylensinterkörper für Anwendungen im Magnet Reader wurden je nach Anforderung im Batch- und im Durchflussverfahren beschichtet. Zur Reinigung und Entgasung der Volumenkörper vor einer Beschichtung wurden diese für 30 Minuten in Aceton unter Vakuum gerührt (5 Polyethylensinterkörper pro ml). Anschließend wurden die Polyethylensinterkörper 3-mal in Ethanol (96%) gewaschen. Die gereinigten Polyethylensinterkörper wurden dann für Batch-Beschichtungen genutzt oder für Durchflussbeschichtungen in Säulenhülsen eingesetzt.

Polystyrolchips

Die zur Beschichtung vorgesehenen Polystyrolchips wurden zuerst mit Prozessklebeband maskiert, um definierte 5x5 mm Messbereiche zu schaffen. Die maskierten Chips wurden anschließend jeweils 3-mal mit Ethanol (96%), Ethanol-Wasser (v/v 1:1) und Millipore®-Wasser gespült. Die Träger wurden zur weiteren Beschichtung im Vakuum getrocknet.

2.10.2 Adsorptive Beschichtung

Polyethylensinterkörper

Eine adsorptive Beschichtung mit Biomolekülen erfolgte mit Polyethylensinterkörpern nur im Durchfluss. Hierzu wurden die fertig zusammengesetzten Säulen mit gereinigten Polyethylensinterkörpern aus Kap. 2.10.1 nochmals mit Ethanol (96%) gespült. Nach einem weiteren Spülschritt mit Ethanol-Wasser (v/v 1:1) wurden die Säulen zweimal mit 0,1 M Carbonat-Puffer pH 9,5 konditioniert. Anschließend erfolgte die Zugabe des zu immobilisierenden Biomoleküls in 0,1 M Carbonat-Puffer pH 9,5. Nach 30-minütiger Inkubation wurden eventuell verbliebende freie Bindungsstellen mit Caseinlösung (Caseinpuffer, 1:10 v/v verdünnt mit 0,1 M Carbonat-Puffer pH 9,5) blockiert. Zur Durchführung des weiteren Assays wurden die Säulen dann mit 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 umgepuffert.

Polystyrolchips

Zur adsorbtiven Beschichtung von Polystyrolchips wurde der zu immobilisierende Antikörper anti-CRP C2 in PBS-Puffer pH 7,3 (0,15 M) oder Carbonat-Puffer pH 8,5 (0,1 M) auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml verdünnt. 10 µl dieser Antikörperlösung wurden dann jeweils auf einen 5x5 mm Messpunkt aufpipettiert. Die Immobilisierung erfolgte selbst-organisierend bei 4°C für 12 Stunden in einem Exsikkator mit gesättigter Wasserdampfatmosphäre. Anschließend wurden die Chips kurz mit Immobilisierungspuffer gespült und entweder feucht oder trocken gelagert. Die feuchte Lagerung erfolgte in PBS-Puffer pH 7,3 (0,15 M) mit 3 mg/ml Albumin (BSA). Zur Trocknung der Chips wurde PBS-Puffer pH 7,4 (0,15 M) mit 3 mg/ml BSA und 10 mg/ml Saccharose auf die Messpunkte pipettiert (je 5 µl) und im Vakuum getrocknet.

Bei der adsorptiven Beschichtung der Polystyrolchips mit Protein A wurden 5 µl einer Protein A-Lösung (500 µg/ml Protein A in Carbonat-Puffer, pH 8,3, 0,15M) auf jeden Messpunkt pipettiert. Die Immobilisierung erfolgte selbst-organisierend bei 4°C für 12 Stunden in einem Exsikkator mit gesättigter Dampfatmosphäre. Anschließend wurden die Chips mit Immobilisierungspuffer gewaschen und wiederum 5 µl der Antikörperlösung auf die Messpunkte pipettiert. Es erfolgte wiederum eine Immobilisierungsinkubation für 12 Stunden in einem Exsikkator mit gesättigter Dampfatmosphäre bei 4°C. Im Anschluss wurden die Chips mit Immobilisierungspuffer gespült und entweder feucht oder trocken gelagert. Die feuchte Lagerung erfolgte in PBS-Puffer pH 7,3 (0,15 M) mit 3 mg/ml Albumin (BSA). Zur Trocknung der Chips wurde wie bereits oben beschrieben PBS-Puffer pH 7,4 (0,15 M) mit 3 mg/ml BSA und 10 mg/ml Saccharose auf die Messpunkte pipettiert (je 5 µl) und im Vakuum getrocknet.

2.10.3 Herstellung einer Aminooberfläche

Goldprismen

Zur Aminofunktionalisierung wurden die gereinigten Goldprismen aus Kap. 2.10.1 sechs Stunden lang in einer Lösung aus 1% (m/v) 3-Aminopropyltriethoxysilan in Toluol (10 ml/Goldprisma) bei Raumtemperatur schüttelnd (250 U/min) aminosilanisiert. Anschließend wurde gründlich mit Toluol (3-mal in jeweils 20 ml) und weiteren Lösungsmitteln bzw. mit Millipore®-Wasser gespült (abhängig von weiterer Beschichtungsmethode). Für anschließende Beschichtungen wurden die Goldprismen ungetrocknet weiterverwendet.

Polyethylensinterkörper

Die Erzeugung einer aminofunktionalisierten Oberfläche auf Polyethylensinterkörpern erfolgte nur im Batch-Verfahren. Hierzu wurden die Volumenkörper nach erfolgter Reinigung jeweils 3-mal mit Ethanol-Wasser (v/v 1:1) und Millipore®-Wasser gespült. Anschließend wurden die Polyethylensinterkörper für 6 Stunden in 30% H_2O_2 (pH 8,5, eingestellt mit NaOH) unter einer UV-Lampe (siehe Tab. 1) inkubiert. Dieser Schritt dient zur Einführung von Hydroxyl-Gruppen auf der Oberfläche des Polyethylens.

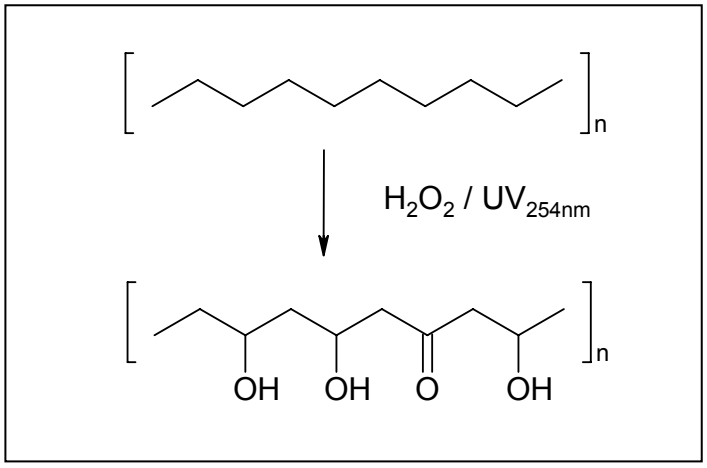


Abbildung 23 **Schematische Darstellung der H_2O_2 / UV-Aktivierung.** Die Inkubierung mit H_2O_2-Lösung und UV-Licht bewirkt eine Einführung von Sauerstoffgruppen in den Polyethylensinterkörper (vereinfachte Darstellung)

Im Anschluss daran wurden die Polyethylensinterkörper 3-mal in Aceton gewaschen und dann für 1 Stunde in Aceton mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES, 0,5 g auf 100 ml Aceton) inkubiert. Hierbei erfolgte die Erzeugung der gewünschten Amino-Oberfläche. Alle Schritte erfolgten mit 5 Polyethylensinterkörpern pro ml Volumen. Abschließend wurden die Polyethylensinterkörper 3-mal in Aceton und Millipore®-Wasser gewaschen. Zur weiteren Verwendung wurden diese dann feucht eingesetzt.

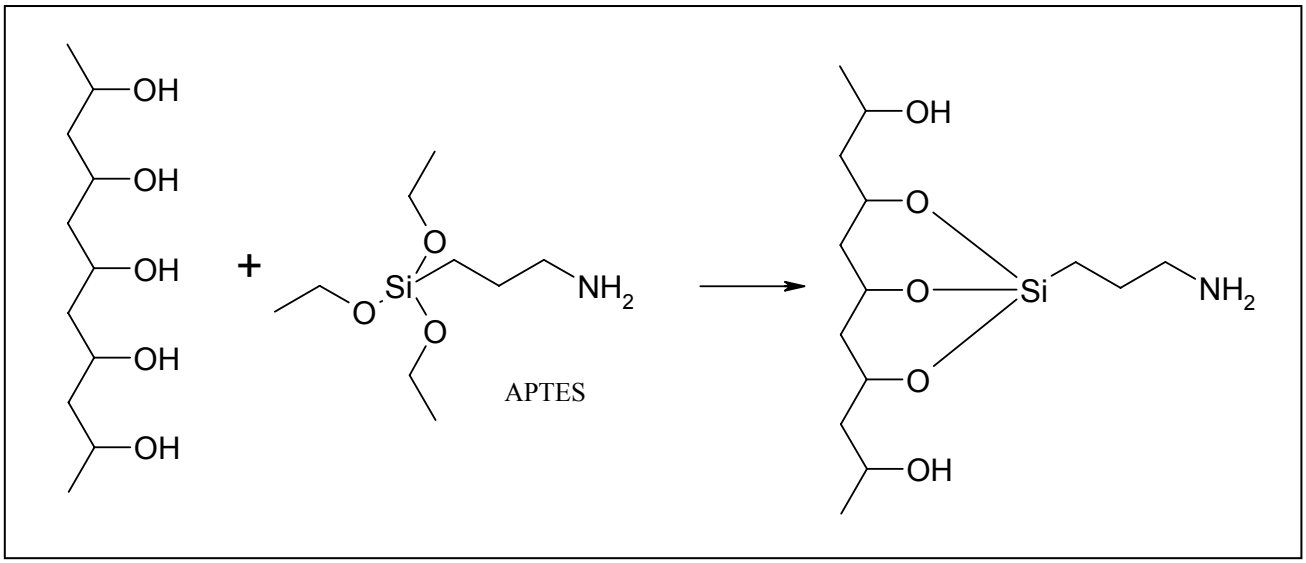


Abbildung 24 **Schematische Darstellung der Amino-Silanisierung.** Auf der aktivierten Oberfläche der Polyethylensinterkörper wird durch Aminopropyltriethoxysilan (APTES) eine Aminooberfläche erzeugt.

Polystyrolchips

Die Aminofunktionalisierung der Polystyrolchips erforderte eine Anpassung der oben beschriebenen Funktionalisierungsprotokolle mit Rücksicht auf die Empfindlichkeit des Polystyrols gegenüber organischen Lösungsmitteln. Zur Erzeugung der aminofunktionalisierten Oberfläche wurde APTES (50 µl pro ml) in Methanol oder Millipore®-Wasser auf die Messpunkte aufgetragen (jeweils 10 µl pro Messpunkt) und für 24 Stunden in einem Exsikkator mit gesättigter Methanol bzw. Dampfatmosphäre inkubiert. Anschließend wurde mit Methanol oder Wasser gespült und die Chips im feuchten Zustand für weitere Immobilisierungsschritte verwendet.

2.10.4 Alkylierung

Goldprismen

Zur Erzeugung einer alkylierten C18-Oberfläche wurden gereinigte Goldprismen aus Kap. 2.10.1 verwendet. Diese wurden je 3-mal mit Millipore®-Wasser, Methanol und Toluol in Bechergläsern gespült. Anschließend wurden die Goldprismen für 6 Stunden in Toluol mit 1% (m/v) Octadecyltrimethoxysilan schüttelnd inkubiert (10 ml Toluol pro Prisma, 250 U/min). Im Anschluss daran wurden die Goldprimen wieder 3-mal mit Toluol, Methanol und Millipore®-Wasser in Bechergläsern gespült. Die Qualität der Alkylierung wurde durch einen Benetzungstest überprüft. Korrekt beschichtete Goldprismen wurden dann im Vakuum getrocknet und in einem Exsikkator bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

Polyethylensinterkörper

Die Erzeugung einer alkylierten C18-Oberfläche erfolgte nur im Batch-Verfahren. Hierzu wurden die Volumenkörper nach erfolgter Reinigung jeweils 3-mal mit Ethanol-Wasser (v/v 1:1) und Millipore®-Wasser gespült. Anschließend wurden die Polyethylensinterkörper für 6 Stunden in 30% H_2O_2 (pH 8,5, eingestellt mit NaOH) unter einer UV-Lampe (siehe Tab. 1) inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Polyethylensinterkörper 3-mal in Toluol gewaschen und dann für 12 Stunden in Toluol mit 1% Octadecyltrimethoxysilan (m/v) inkubiert. Alle Schritte erfolgten mit 5 Polyethylensinterkörpern pro ml Volumen. Abschließend wurden die

Polyethylensinterkörper jeweils 3-mal in Toluol und Millipore®-Wasser gewaschen und in Millipore®-Wasser bei 4°C bis zu ihrer weiteren Verwendung aufbewahrt.

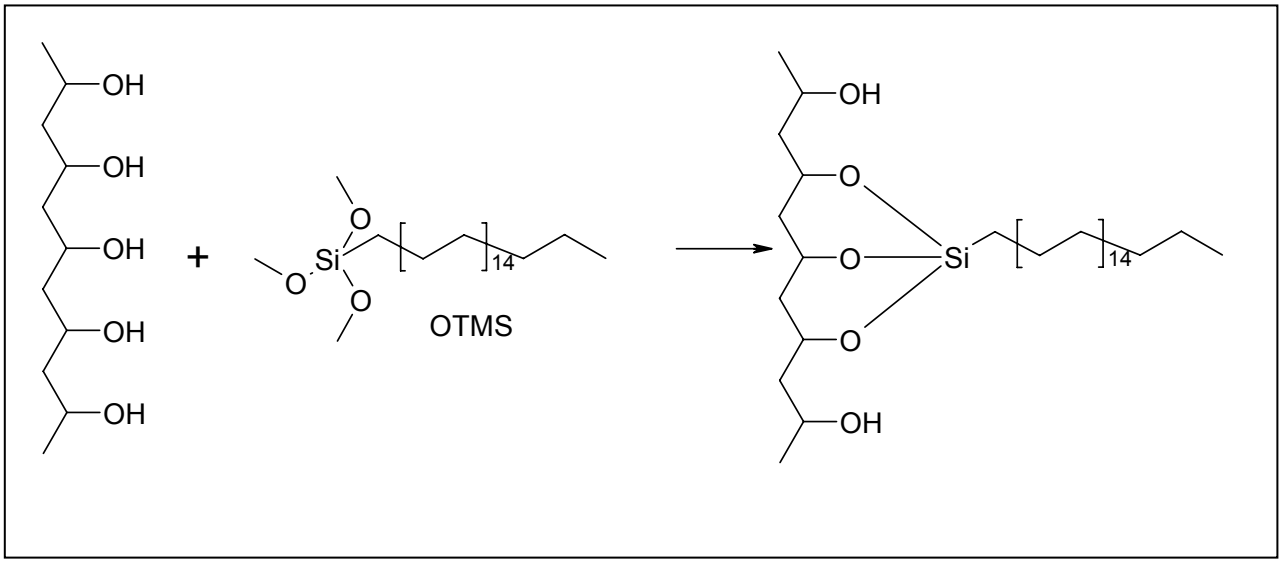


Abbildung 25 Schematische Darstellung der Alkylierung. Auf der aktivierten Oberfläche der Polyethylensinterkörper wird durch Octadecyltrimethoxysilan (OTMS) eine alkylierte Oberfläche erzeugt.

2.10.5 Biotinylierung

Goldprismen

Zur Biotinylierung wurden die aminosilanisierten, ungetrockneten Goldprismen aus Kap. 2.10.3 zunächst 3-mal mit Dimethylformamid (DMF) gespült. Im Anschluss daran wurden sie in einer Lösung von Biotin-NHS in DMF (1mg/ml; 10 ml/Goldprisma) zwölf Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (250 U/min) inkubiert. Danach wurde 3-mal mit DMF, dann 3-mal mit Millipore®-Wasser gespült. Die so behandelten Träger wurden im Vakuum getrocknet und bis zu ihrer weiteren Verwendung in einem Exsikkator gelagert.

2.10.6 Kovalente Kopplung von Biomolekülen

Zur kovalenten Kopplung von Biomolekülen an Polyethylensinterkörpern und Polystyrolchips wurden verschiedene Techniken verwendet.

Polyethylensinterkörper

NHS/DCC-Methode

Die aminofunktionalisierten Sinterkörper aus Abs. 2.10.3 wurden in einem ersten Schritt mit Bernsteinsäure verestert. Hierzu wurden 40 mg Bernsteinsäureanhydrid pro ml in Phosphatpuffer (pH 6,0) gelöst. In dieser Lösung wurden die aminofunktionalisierten Polyethylensinterkörper für 12 Stunden rührend inkubiert. Die nachfolgende Reaktion mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) führte zu einer Aktivierung der Carboxygruppen. Hierzu wurden die Polyethylensinterkörper jeweils 3-mal mit Millipore®-Wasser, Methanol und Dioxan gespült. Anschließend wurden diese in eine Lösung aus 20 mg NHS und 40 mg DCC pro ml Dioxan gegeben. Dieser Reaktionsanastz wurde für 4 Stunden rührend inkubiert.

Die Sinterkörper wurden nun je 3-mal in Dioxan, Methanol und Millipore®-Wasser gespült. Im Anschluss wurden diese dann zu einer Lösung des zu immobilisierenden Biomoleküls in 0,1 M Carbonatpuffer (pH 8,3) gegeben. Die Konzentration wurde je nach eingesetztem Biomolekül variiert und wird bei den jeweiligen Versuchen angegeben. Der Ansatz wurde für jeweils 3 Stunden inkubiert. Danach wurden die Polyethylensinterkörper mit 0,1 M Carbonatpuffer (pH 8,3) gespült. Etwaige verbleibende freie Bindungsstellen wurden mit Caseinpuffer verdünnt in Carbonatpuffer (v/v 1:10), abgesättigt. Die Reaktion wurde für weitere 12 Stunden fortgesetzt.

Die Mengen aller Lösungsmittel, Puffer und Reaktionslösungen wurden so gewählt, dass pro 1 ml Flüssigkeit 5 Sinterkörper eingesetzt wurden.

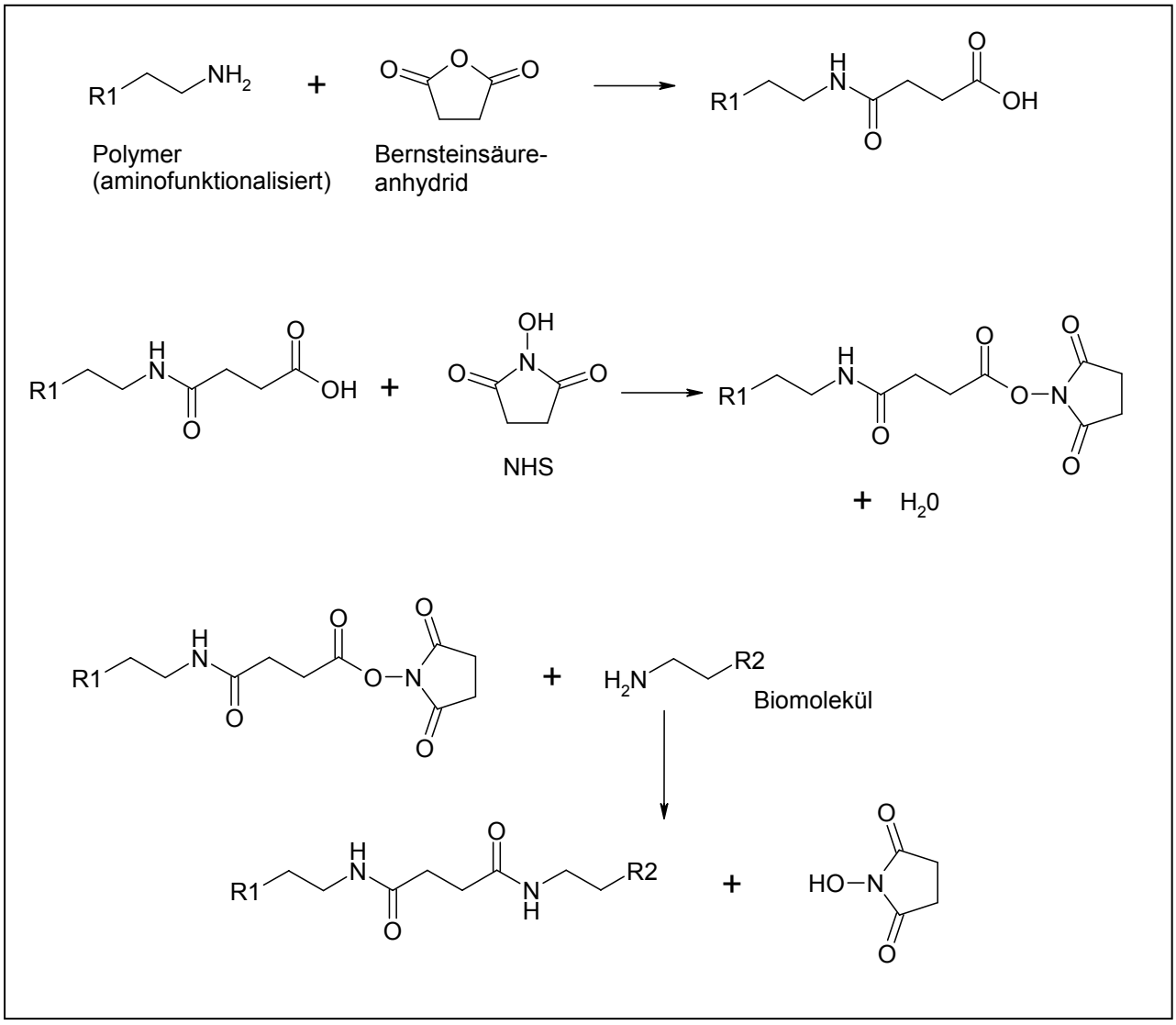


Abbildung 26 **Schematische Darstellung der NHS/DCC-Kopplung.** Auf der aktivierten Aminooberfläche der Polyethylensinterkörper wird unter Verwendung von Bernsteinsäureanhydrid und N-Hydroxy-succimid ein Aktivester erzeugt. Hieran kann mit einer Peptidbindung unter Verwendung von DCC ein Biomolekül gekoppelt werden.

GDA-Methode

Auch für diese Methode wurden aminofunktionalisierte Polyethylensinterkörper aus Kap. 2.10.3 verwendet. Bei Glutardialdehyd (GDA) handelt es sich um einen homofunktioniellen Linker mit zwei Aldehydgruppen. Diese binden unter Bildung einer Schiff'schen Base (Iminbindung) an einer Aminofunktionalisierung oder an einem Aminosäurerest (z. B. Lysin). Für diese Kopplungsmethode wurden aminofunktionalisierte Polyethylensinterkörper in einer GDA-Lösung (2,5% v/v in 0,1 M Phosphat-Puffer pH 7,0) für 6 Stunden rührend inkubiert. Anschließend erfolgte die Kopplung der Biomoleküle in einer Carbonatpufferlösung (0,1 M, pH 8,5) mit verschiedenen Konzentrationen der

unterschiedlichen Biomoleküle. Die Sinterkörper wurden in dieser Lösung für 3 Stunden inkubiert, danach mit Carbonatpuffer gespült und über Nacht bei 4°C in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 mit 3 mg/ml BSA zur Absättigung freier Bindungsstellen gerührt. Die Lagerung der funktionalisierten Polyethylensinterkörper erfolgte feucht in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3. Es wurden jeweils 5 Sinterkörper pro ml Flüssigkeitsvolumen eingesetzt.

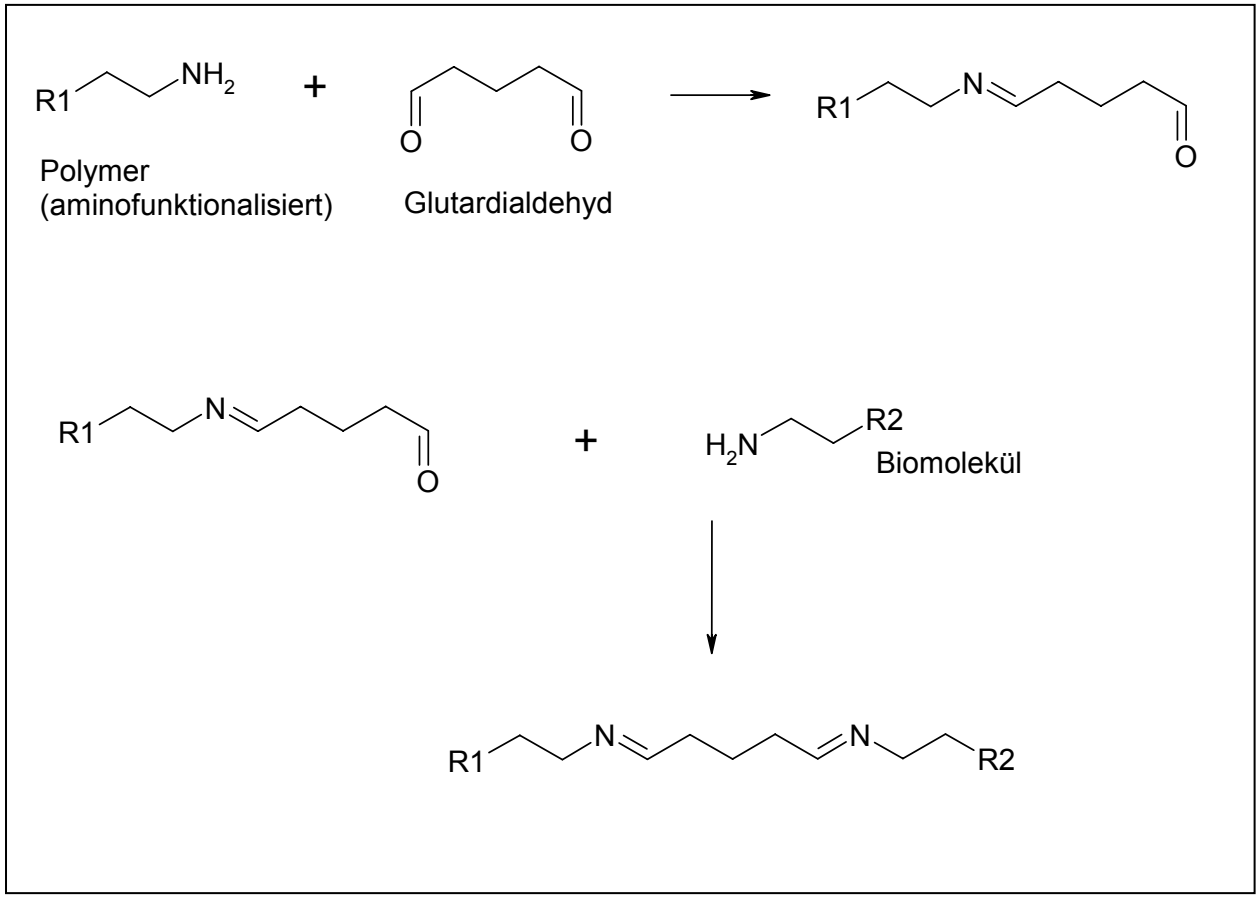


Abbildung 27 **Schematische Darstellung der GDA-Kopplung.** Auf der aktivierten Aminooberfläche der Polyethylensinterkörper wird unter Verwendung von Glutardialdehyd ein homologer, bifunktioneller Linker eingesetzt. Die Bindung an die Amino-Oberfläche und an das Biomolekül erfolgt über eine Imin-Bindung.

FNPA-Methode

Als alternative kovalente Kopplungsreagenzien wurden auch UV-Linker eingesetzt. Bei 4-Fluoro-3-nitro-phenylazid (FNPA) handelt es sich um einen bifunktionellen Linker (siehe Abb. 28). Zur Immobilisierung wurden die gereinigten Polyethylensinterkörper unter UV-Licht in einer FNPA-Lösung (1 mg pro ml Methanol) solange rührend inkubiert, bis alles Methanol verdampft war. Die trockenen Sinterkörper wurden dann noch weitere 15 Minuten unter der UV-Lampe schüttelnd bewegt, um alle Seiten der Sinterkörper

ausreichend zu beleuchten. Da die Polymerketten von Polyethylen und Polystyrol für CH-Insertionen eher schlecht zugänglich sind, kommt es wahrscheinlich zu UV- und Sauerstoff- induzierten Intermediaten oder zu einer CH-Insertion an den Endpunkten der einzelnen Polymerketten (-CH_3), da immer eine Vielzahl von Polymerketten zu größeren Kunststoffkörpern thermisch geformt wird. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine Kopplung des FNPA nur an die vom UV-Licht erreichbaren Aussenflächen der Sinterkörper erfolgte. Im Anschluss wurden die Polyethylensinterkörper mit 0,1 M Carbonatpuffer pH 8,5 3-mal gespült. Die Kopplung des Biomoleküls erfolgte als Lösung in 0,1 M Carbonatpuffer pH 8,5 für 3 Stunden unter Rühren. Anschließend wurden die Sinterkörper mit Carbonatpuffer gespült und über Nacht bei 4°C in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 mit 3 mg/ml BSA zur Absättigung freier Bindungsstellen gerührt. Die Lagerung der funktionalisierten Polyethylensinterkörper erfolgte feucht in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 bei 4°C. Es wurden wiederum jeweils 5 Sinterkörper pro ml Flüssigkeitsvolumen eingesetzt.

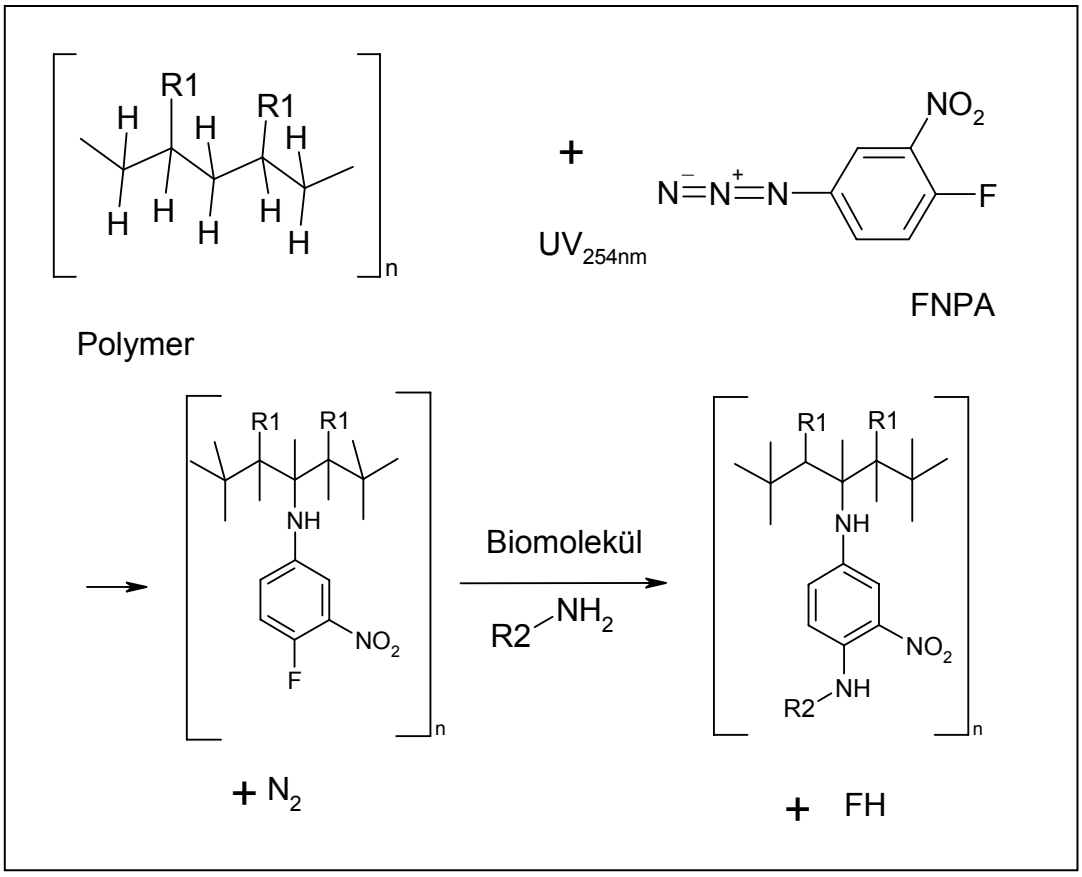


Abbildung 28 Schematische Darstellung der FNPA-Immobilisierung.

R1 = H bei Polyethylen oder R1 = Styrolrest bei Polystyrol, R2 = Biomolekül

Sulfo-HSAB-Methode

Eine weitere Kopplungsmethode mit UV-Linkern ist der Einsatz des wasserlöslichen Hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoat (Sulfo-HSAB).

Die gereinigten Polyethylensinterkörper wurden in einer Sulfo-HSAB-Lösung (2 mg/ml 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3) unter UV-Licht für ca. 15 Minuten rührend inkubiert.

Da auch hier die Polymerketten von Polyethylen und Polystyrol für CH-Insertionen eher schlecht zugänglich sind, kommt es wahrscheinlich ebenfalls zu UV- und Sauerstoff-induzierten Intermediaten oder zu einer CH-Insertion an den Endpunkten der einzelnen Polymerketten ($-CH_3$). Anschließend wurden die Sinterkörper mit 0,1 M Carbonatpuffer pH 8,5 3-mal gespült. Die Kopplung des Biomoleküls erfolgte als Lösung in 0,1 M Carbonatpuffer pH 8,5 für 3 Stunden unter Rühren. Anschließend wurden die Sinterkörper mit Carbonatpuffer gespült und über Nacht bei 4°C in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 mit 3 mg/ml BSA zur Absättigung freier Bindungsstellen gerührt.

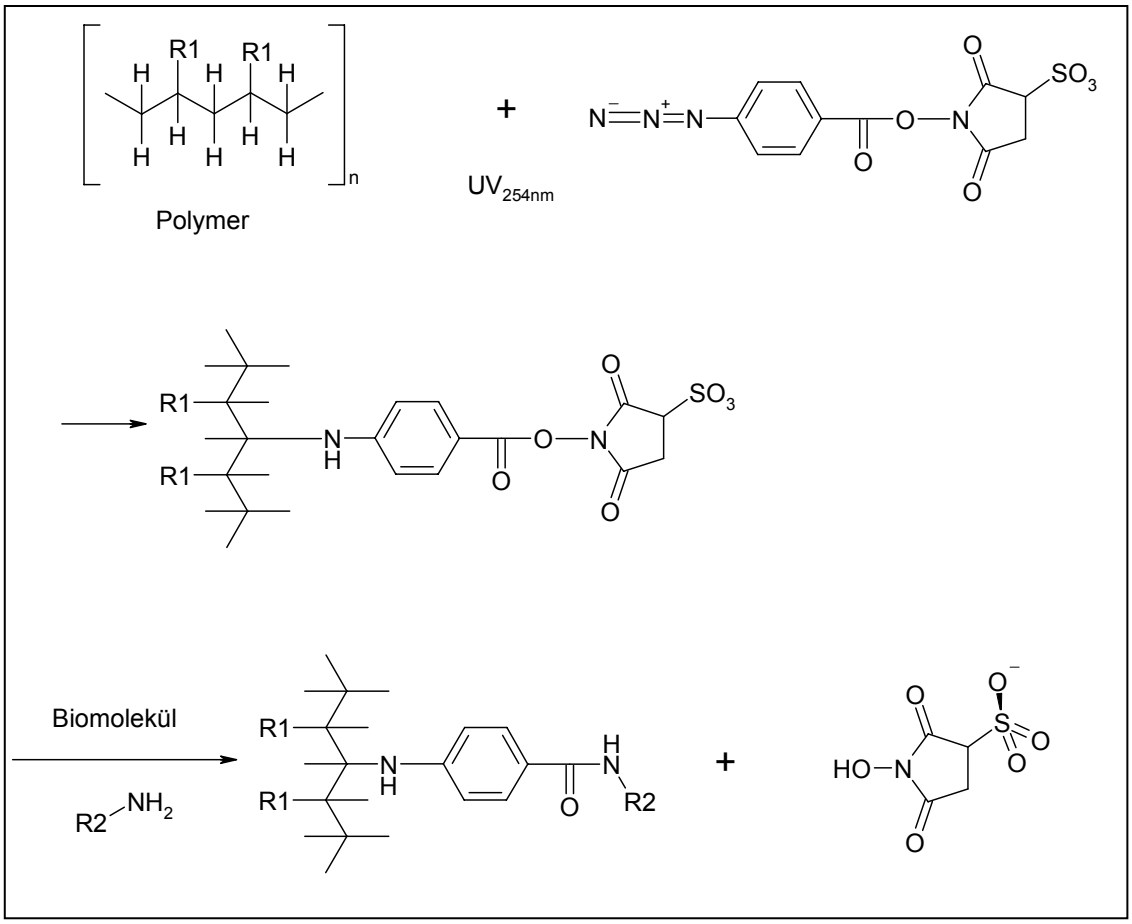


Abbildung 29 Schematische Darstellung der Sulfo-HSAB-Immobilisierung.
R1 = H bei Polyethylen oder R1 = Styrolrest bei Polystyrol, R2 = Biomolekül

Die Lagerung der funktionalisierten Polyethylensinterkörper erfolgte bei 4°C feucht in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3. Es wurden wiederum jeweils 5 Sinterkörper pro ml Flüssigkeitsvolumen eingesetzt. Auch bei dieser Immobilisierungsmethode muss davon ausgegangen werden, dass eine UV-vermittelte Bindung des Sulfo-HSAB nur an den vom UV-Licht erreichbaren Aussenflächen mit einer geringen Eindringunstiefe erfolgte.

Polystyrolchips

NHS/DCC-Methode

Diese kovalente Immobilsierungsmethode geht von aminofunktionalisierten Oberflächen aus. Hierzu wurden Chips aus Kap. 2.10.3 oder plasma-aminofunktionalisierte Polystyrolchips verwendet. Pro Messpunkt wurden 5 µl einer Bernsteinsäureanhydrid-Lösung (40 mg/ml in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0) aufgetragen. Nach 12-stündiger Inkubation in einem Exsikkator mit gesättigter Dampfatmosphäre wurde mit Phosphatpuffer gespült und pro Messpunkt 5 µl einer NHS/DCC-Lösung aufpipettiert (20 mg NHS und 40 mg DCC pro ml Methanol). Die Chips wurden nun 1 Stunde in gesättigter Methanolatmosphäre inkubiert und anschließend mit Carbonatpuffer pH 8,5 (0,1 M) gespült. Die eigentliche Kopplung des Biomoleküls erfolgte durch Aufbringen von 5 µl Anti-CRP C2 Lösung (100 µg/ml in 0,1 M Carbonatpuffer pH 8,5). Die Ansätze wurden für 12 Stunden bei 4°C in gesättigter Dampfatmosphäre in einem Exsikkator inkubiert. Nach einem weitern Spülschritt mit Immobilisierungspuffer wurden verbleibende freie Bindungsstellen mit einer Ethanolamin-Lösung (60 µl/ml in Millipore®-Wasser) abgesättigt. Die Lagerung der Polystyrolchips erfolgte feucht oder trocken. Zur feuchten Lagerung wurden diese in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 mit BSA (3 mg/ml) gegeben. Die trockene Lagerung erfolgte nach Vakuumtrocknung mit 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 mit 3 mg BSA und 10 mg Saccharaose pro ml (10 µl pro Messpunkt) in einem Exsikkator.

GDA-Methode

Eine Kopplung von Biomolekülen an die Oberfläche von Polystyrolchips mithifle von Glutardialdehyd (GDA) erfolgte als Cross-linking von Aminofunktionen. Dementsprechend muss auch die Chip-Oberfläche eine Aminofunktionalisierung aufweisen. Hierzu wurden aminofunktionalisierte Chips (s.o.) oder plasma-aminofunktionalisierte Chips verwendet. Pro Messpunkt wurden 5 µl einer GDA-Lösung (2,5% v/v in 0,1 M Phosphat-Puffer pH 7,0) aufgebracht und für 5 Stunden in einem

Exsikkator mit gesättigter Dampfatmosphäre inkubiert. Nach einem Spülschritt mit Phosphatpuffer wurde das zu koppelnde Biomolekül aufpipettiert. Hierzu wurden 5 µl einer anti-CRP C2-Lösung mit 100 µg Antikörper pro ml 0,1 M Carbonat-Puffer pH 8,5 verwendet. Nach 12-stündiger Inkubation bei 4°C in gesättigter Dampfatmosphäre wurde mit Immobilsierungspuffer gespült. Anschließend wurden verbleibende freie Bindungsstellen mit einer Ethanolamin-Lösung (60 µl/ml in Millipore®-Wasser) abgesättigt. Die Lagerung dieser Polystyrolchips erfolgte wiederum feucht oder trocken. Zur feuchten Lagerung wurden diese in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 mit BSA (3 mg/ml) gegeben. Die trockene Lagerung erfolgte nach Vakuumtrocknung mit 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 mit 3 mg BSA und 10 mg Saccharaose pro ml (10 µl pro Messpunkt) in einem Exksikator.

FNPA-Methode

Die Immobilsierung von Biomolekülen durch Einsatz von 4-Fluoro-3-Nitro-phenylazid erfolgt als heterologe Spacer-Kopplung. Das FNPA wird durch UV-Licht an die Oberfläche des Polystyrols gekoppelt. Hierzu werden 2x2 µl FNPA-Lösung (1mg pro ml Methanol) pro gereinigten Messpunkt eingetrocknet und dann für 30 Minuten unter UV-Licht gekoppelt. Anschließend wurden die Polystyrolchips kurz mit Millipore®-Wasser gespült und dann pro Messpunkt 5 µl anti-CRP C2-Lösung (100 µg/ml in 0,1 M Carbonatpuffer pH 8,5) aufgetragen. Die Ansätze wurden dann für 1 Stunde in gesättigter Dampfatmosphäre inkubiert, nachfolgend mit Immobilisierungspuffer gespült. Anschließend wurden verbleibende freie Bindungsstellen mit einer Ethanolamin-Lösung (60 µl/ml in Millipore®-Wasser) abgesättigt. Die Lagerung dieser Polystyrolchips erfolgte wiederum feucht oder trocken. Zur feuchten Lagerung wurden diese in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 mit BSA (3 mg/ml) gegeben. Die trockene Lagerung erfolgte nach Vakuumtrocknung mit 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 mit 3 mg BSA und 10 mg Saccharaose pro ml (10 µl pro Messpunkt) in einem Exsikkator.

Sulfo-HSAB-Methode

Hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoate (Sulfo-HSAB) ist ein weiterer bifunktioneller UV-Linker (siehe Abb. 29). Sein Vorteil liegt in der Wasserlöslichkeit dieses Moleküls. Zur Kopplung wurden gereinigte Polystyrolchips mit 5 µl einer Sulfo-HSAB-Lösung (2 mg/ml 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3) pro Messpunkt versehen. Nach kurzer Inkubation bei RT wurde der Chip für 15 Minuten mit UV-Licht behandelt. Anschließend wurden die

Polystyrolchips kurz mit Millipore®-Wasser gespült und dann pro Messpunkt 5 µl anti-CRP C2-Lösung (100 µg/ml in 0,1 M Carbonatpuffer pH 8,5) aufgetragen. Die Ansätze wurden dann für 1 Stunde in gesättigter Dampfatmosphäre inkubiert, nachfolgend mit Immobilisierungspuffer gespült. Anschließend wurden verbleibende freie Bindungsstellen mit einer Ethanolamin-Lösung (60 µl/ml in Millipore®-Wasser) abgesättigt. Die Lagerung dieser Polystyrolchips erfolgte wiederum feucht oder trocken. Zur feuchten Lagerung wurden diese in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 mit BSA (3 mg/ml) gegeben. Die trockene Lagerung erfolgte nach Vakuumtrocknung mit 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 mit 3 mg BSA und 10 mg Saccharaose pro ml (10 µl pro Messpunkt) in einem Exsikkator.

2.11 Modifizierung von Biomolekülen

2.11.1 Biotinylierung an einer Aminogruppe

Zur Biotinylierung eines Antikörpers an Aminogruppen musste zuerst der Antikörper-lagerpuffer gegen Biotinylierungspuffer ausgetauscht werden. Dies erfolgte per Dialyse in Tube-O-Dialyzer-Einheiten mit einem Größenauschluss von 1 kDa. Hierzu wurde zuerst die Dialysemembran in 0,1 M Carbonatpuffer pH 8,5 gewässert. Die Antikörperlösung wurde auf eine Konzentration von 2 mg/ml mit Carbonatpuffer verdünnt. Die Dialyse erfolgte gegen Carbonatpuffer bei 4°C unter Rühren für 12 Stunden. Hierbei wurde der Dialysepuffer zweimal gewechselt. Die Biotinylierung erfolgte mithilfe von Biotin-NHS. Dieses wurde als Lösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) eingesetzt (3 mg Biotin-NHS in 1 ml DMSO). Zur eigentlichen Biotinylierung wurde die dialysierte Antikörperlösung in ein PP-Röhrchen überführt und mit 1/10 (v/v) seines Volumens an Biotin-NHS-Lösung versetzt. Der Ansatz wurde sofort durchmischt und anschließend für 3 Stunden schüttelnd inkubiert (100U/min). Anschließend wurde die Reaktionslösung wieder in eine Dialyseeinheit gefüllt und gegen 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 bei 4°C für 12 Stunden dialysiert. Die Dialyse erfolgte unter Rühren mit zweifachem Pufferwechsel. Der eingesetzte PBS-Puffer hatte eine erhöhte Konzentration des Konservierungsmittels Bronidox von 0,12% (w/v). Nach erfolgter Dialyse erfolgte eine Konzentrationsbestimmung des biotinylierten Antikörpers per photometrischen Bradford-Test. Amino-biotinylierte Antikörper konnten bei 4°C für mehrere Wochen ohne Qualitätsverlust gelagert werden.

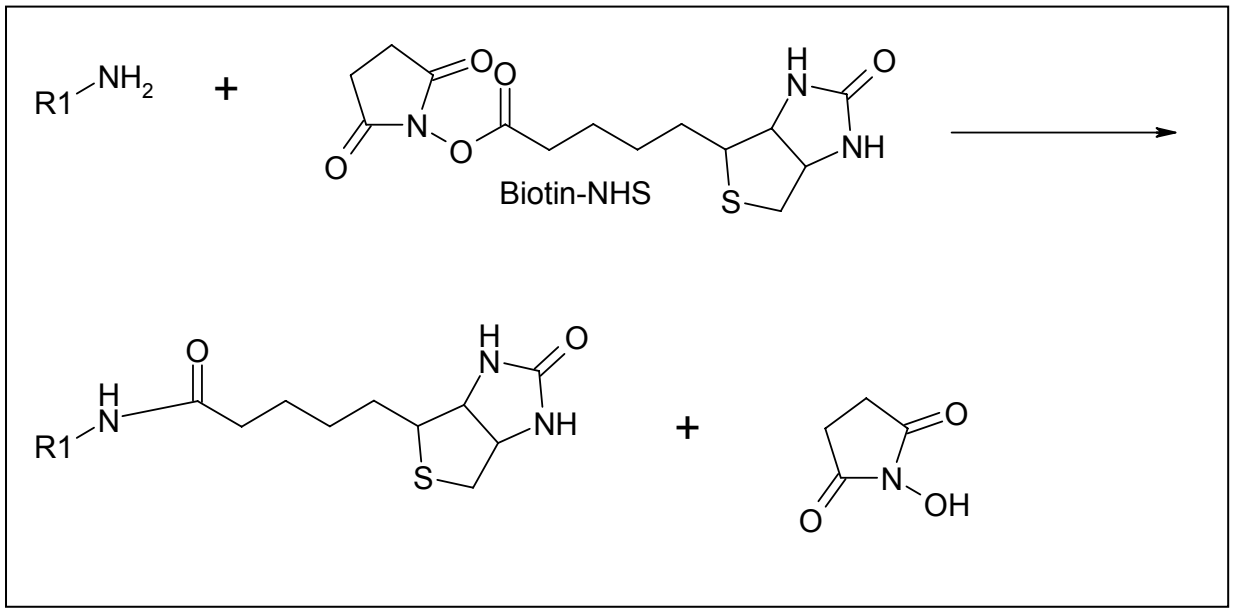


Abbildung 30 Biotinylierung mit Biotin-NHS an einer Amino-Gruppe

2.11.2 Biotinylierung an einer Carboxylgruppe

Wie bei der Biotinylierung der Aminogruppen eines Antikörpers wurde zuerst eine Dialyse der Antikörperlösung durchgeführt. Die Dialyse erfolgte in Tube-O-Dialyzern mit einem molekularen Auschluss von 1 kDa. Die Membran wurde in Dialysepuffer (0,1 M MES-Puffer pH 5,5) vorgequollen und der Antikörper mit Dialysepuffer auf eine Konzentration von 2 mg/ml verdünnt. Die Dialyse erfolgte für 12 Stunden bei 4°C unter Rühren mit zweifachem Pufferwechsel. Die dialysierte Antikörperlösung wurde nun in ein PP-Röhrchen überführt und nach einem Protokoll der Firma Pierce mit Biotin-$(PEO)_3$-Amin biotinyliert. Hierzu wurde die Antikörperlösung mit 1/3 ihres Volumen (v/v) einer 0,25 mM Biotin-Amin-Lösung in 0,1 M MES-Puffer pH 5,5 versetzt. Zusätzlich wurde 1/4 des Volumens der Antikörperlösung einer Dimethylaminopropyl-ethylcarbodiimid (EDC)-Lösung (2 mg/ml) in MES-Puffer zugegeben. Die EDC-Lösung wurde erst unmittelbar vor Gebrauch angesetzt. Der Ansatz wurde sofort durchmischt und für 2 Stunden schüttelnd inkubiert (100 U/min). Anschließend wurde die Reaktionslösung ebenfalls wieder in eine Dialyseeinheit gefüllt und gegen 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 bei 4°C für 12 Stunden dialysiert. Die Dialyse erfolgte unter Rühren mit zweifachem Pufferwechsel. Der eingesetzte PBS-Puffer hatte eine erhöhte Konzentration des Konservierungsmittels Bronidox von 0,12% (w/v). Nach erfolgter Dialyse erfolgte eine Konzentrationsbestimmung des biotinylierten Antikörpers per photometrischen Bradford-Test. Der carboxybiotinylierte Antikörper wurde sofort verwendet.

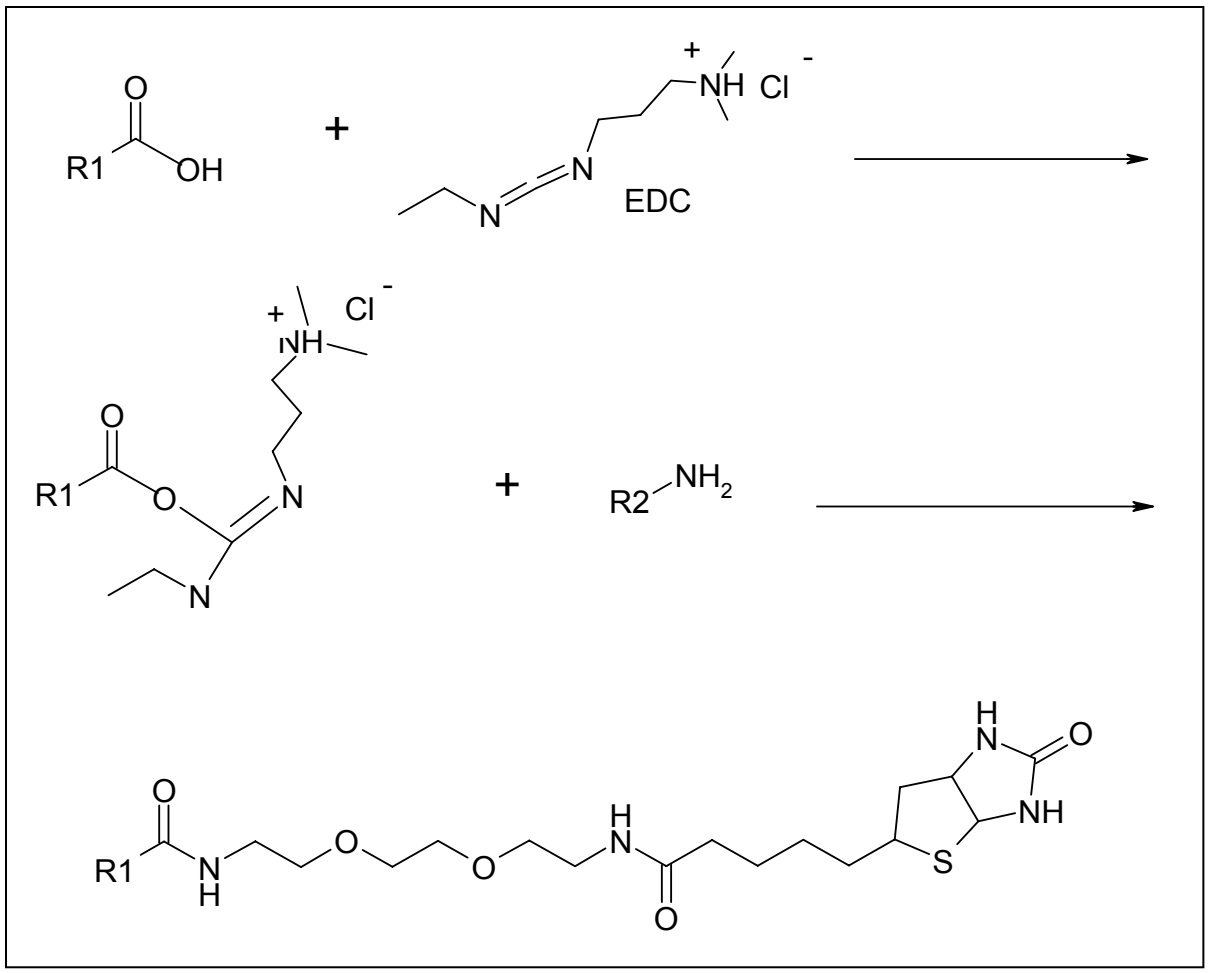


Abbildung 31 **Biotinylierung mit EDC an Carboxylgruppen.** R1 = restliches Biomolekül, R2 = Biotin-(PEO_3)-Amin.

2.12 Molekularbiologische Methoden

2.12.1 Herstellung Hitzeschock-kompetenter Zellen

Um erfolgreich Vektoren transformieren zu können, müssen die Zielorganismen eine DNA-Aufnahmefähigkeit (Kompetenz) aufweisen. Hierfür wurden Hitzeschock-kompetente *E. coli* BL21 (DE3) hergestellt.

Hierzu wurde eine Vorkultur von *E. coli* über Nacht in 100 mL LB-Medium (Tab. 10) bei 37°C und 200 U•min^{-1} angezogen. Von dieser Vorkultur wurde 1 mL zur Inokulation von weiteren 100 mL LB-Medium als Hauptkultur eingesetzt. Bei ebenfalls 37°C und 200 U•min^{-1} wurde diese Kultur bis zu einer Optischen Dichte (OD_{550nm}) von 0,6 inkubiert. Die fermentierten Zellen wurden für 10 min auf Eis gekühlt und 5 Minuten bei 3500 g und 4°C pelletiert. Die Bakterienpellets wurden in 30 mL eiskaltem TfBI-Puffer (Tab. 8)

aufgenommen und auf Eis vorsichtig resuspendiert. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation für fünf Minuten bei 3500 g und 4°C. Das Pellet wurde in 4 mL TfBII-Puffer (Tab. 8) aufgenommen und ebenfalls auf Eis resuspendiert. Die gewonnene Zellsuspension ist in Aliquots zu 200 µL in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren worden. Eine Lagerung der Zellen erfolgte bei -80° C.

2.12.2 Transformation von Bakterien

Zur Transformation wurden 200 µL Hitzeschock-kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension ist mit 10 µL DNA-Lösung (z. B. aus Kap. 2.8.3) versetzt, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert worden. Der nun folgende 2-minütige Hitzeschock von 42°C initiierte die Aufnahme der zugegebenen DNA in die Zellen. Danach wurden die Ansätze für zwei Minuten auf Eis abgekühlt und zur Regenerierung mit 500 µL LB-Medium (Tab. 10) bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Abschließend erfolgte die Ausplattierung der Ansätze auf LB-Platten (Tab. 10), die mit dem jeweiligen Antibiotikum (Tab. 11) als Selektionsmarker versetzt waren. Diese Platten wurden für 12-24 h bei 37°C inkubiert.

2.13 Kulturbedingungen

Die Kultur der *E. coli*-Klone erfolgte auf Agarplatten zur Stammhaltung und in Flüssigkultur. Solche Flüssigkultur-Fermentationen erfolgten in Schüttelkolben mit Schikanen zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung im Kulturmedium.

2.13.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung des *E. coli*-Stammes und der transformierten Klone erfolgte auf LB-Agarplatten (Tab. 10). Die Mikroorganismen wurden alle 14 Tage auf frische Platten überimpft. Die Inkubation erfolgte für 24-36 h bei 37° im Brutschrank. Die anschließende Aufbewahrung fand bei 4°C im Kühlraum statt. Zusätzlich erfolgte eine Stammhaltung aller *E. coli*-Stämme und der erzeugten Klone in Kryokultur (in 50 %iger Glycerinlösung) bei -80°C.

2.13.2 Wachstumsbedingungen

Zur Bestimmung der Wachstumskurven der verschiedenen *E. coli*-Klone wurden diese in 1000-mL-Erlenmeyer-Kolben kultiviert. Die Medienfüllmenge pro Kolben betrug 400 mL des jeweiligen Mediums. Jeder Kolben wurde mit 5 mL einer Vorkultur (50 mL LB-Medium in einem 300-mL-Erlenmeyerkolben, 37°C, 125 U/min, 14 h) angeimpft und dann bei 37°C mit 125 U/min für 10 h in einem Infors-Inkubator (Tab. 1) kultiviert. Die Inokulation der Vorkultur erfolgte direkt mit einer Impföse und Zellmaterial einer bewachsenen Agarplatte.

2.14 Analytik des Zellwachstums

Zur Überwachung des Fermentationsverlaufes wurde das Zellwachstum durch regelmäßige Bestimmungen der optischen Dichte kontrolliert.

Optische Dichte

Die Optische Dichte (OD) des Kulturmediums wurde in regelmäßigen Abständen bei 585 nm gegen Luft gemessen. Bei Messwerten größer als 0,5 wurde die Probe entsprechend verdünnt. Zur Bestimmung des Zuwachses ist der jeweils verdünnte Blindwert des Kulturmediums vom Messwert abgezogen worden.

2.15 Proteinaufarbeitung

Zur Analyse des fermentierten Proteins ist ein Zellaufschluss mit anschließender Aufreinigung der Rohextrakte unerlässlich. Proteine mit angefügtem His_6-tag (angefügte Sequenz mit 6 Histidin-Resten) konnten mithilfe der IMAC-FPLC aufgereinigt werden. Im Zuge der weiteren Proteinaufreinigung wurden aufgereinigte Proteine aufkonzentriert oder durch Dialyse und anschließender Lyophilisation langfristig zur Lagerung stabilisiert.

2.15.1 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss der fermentierten Zellen erfolgte mit einer kombinierten Lysozym-Ultraschall-Methode. Auf Eis aufgetaute Zellen wurden mit 5-8 mL Lysepuffer (Tab. 9) versetzt und nach guter Durchmischung für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Ultraschallaufschluss mit drei Intervallen von jeweils 20 s und 70 % der maximalen Leistung unterzogen. Dieser fand ebenfalls auf Eis statt. Entstandene

Zelltrümmer ließen sich mit einer 30-minütigen Zentrifugation bei 15000 g und 4°C abtrennen. Der abgetrennte Überstand wurde sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,22 µm Porenweite) und bei 4°C gelagert. Der gewonnene Überstand wird im Folgenden als Rohextrakt bezeichnet.

2.15.2 Aufreinigung mit der IMAC-FPLC

Mit der „immobilidized-metal affinity chromatography“ (IMAC) können His_6-tag enthaltende Proteine unter Verwendung chelatbildender Matrices aufgereinigt werden (PORATH et al., 1975). Diese Methode bietet eine hohe Aufreinigungsleistung ohne die Notwendigkeit mehrfacher, aufwendiger und verlustreicher Reinigungsschritte. Zudem ist die Methode sehr proteinschonend. Nachteile sind die Notwendigkeit eines eventuell aktivitätshemmenden His_6-tag und die relativ hohe Verdünnung der Zielproteine im Elutionsvolumen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete FPLC-Anlage (Tab. 1) zur Proteinaufreinigung ist mit einer mit Nickel beladenen Nitrilotriessigsäure-Matrix (Ni-NTA-Matrix, Tab. 1) versehen. Bei der Nitrilotriessigsäure-Matrix handelt es sich um einen vierzähnigen Liganden, d. h. sie ist in der Lage vier der sechs möglichen Bindestellen des Ni^{2+}-Ions zu komplexieren.

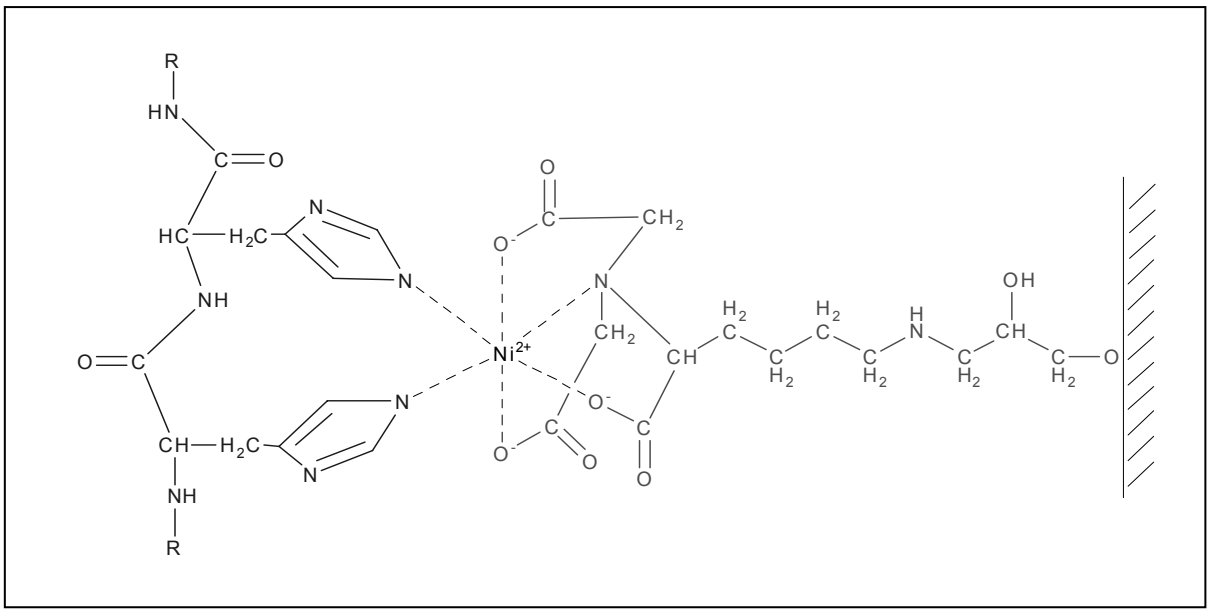


Abbildung 32 Interaktion des His6-tags eines Enzyms (links) mit der an Cellulose gebundenen Ni-NTA Matrix.

Die verbleibenden zwei Bindungsstellen des Ni^{2+}-Ions können mit Histidin-Resten des His_6-tags interagieren; hierdurch werden diese Proteine fest an die Matrix gebunden. Nach

einer Beladung der Säulenmatrix mit Rohextrakt werden unspezifische Bindungspartner und nicht interagierende Bestandteile des Rohextraktes durch den Fluss des Bindepuffers ausgewaschen. Binde- und Elutionspuffer (Tab. 8) enthalten das Histidin-Strukturanalogon Imidazol. Die Elution der gebundenen Proteine wird durch die Zuleitung von Elutionspuffer und somit durch eine höhere Imidazolkonzentration eingeleitet. Die gebundenen His_6-tag-haltigen Proteine werden durch Imidazol von den Bindungstellen des Ni^{2+}-Ions verdrängt. Über den UV-Detektor der FPLC-Anlage können die zielproteinhaltigen Fraktionen ermittelt werden. Diese werden weiteren Aufarbeitungsschritten unterzogen.

2.15.3 Konzentrierung

Zur Konzentrierung von Zielproteinen aus der IMAC-Aufreinigung (Kap. 2.11.2) wurden Vivaspin-Zentrifugationsröhrchen (SARTORIUS VIVASCIENCE, Hannover) verwendet. Diese Ultrafiltrationseinheiten fassen ein Volumen von 8 mL und eigneten sich daher für eine Konzentrierung der IMAC-FPLC-Fraktionen (6-8 mL). Die Vivaspin-Zentrifugationsröhrchen hatten eine Ausschlussgröße von 50 kDa. Es wurde 75 min mit 3800 g bei 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Retentat konnte zur weiteren Verwendung (Kap. 2.15) bei 4°C gelagert oder weiterverarbeitet (Kap. 2.11.5) werden.

2.15.4 Dialyse

Zur Entfernung störender Imidazolreste wurden aufgereinigte Enzymlösungen dialysiert. Hierzu ist die Enzymlösung in eine Dialysiereinheit mit einer Ausschlussgröße von 10-18 kDa gefüllt und für 20 h bei 4°C in 0,15 M PBS-Puffer gegeben worden. Der Puffer wurde in regelmäßigen Abständen von 8-12 h ausgetauscht. Nach der Dialyse wurden die Proteinlösungen bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.16 Proteinbestimmung

Um eine Aussage über die Ausbeute einer Proteinfermentation tätigen zu können, ist eine Bestimmung der Proteinkonzentration notwendig. Hierfür wurde die Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) eingesetzt. Grundlage dieser Methode ist die Fähigkeit von Proteinen, den Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 in saurer Lösung zu binden. Je höher der Proteingehalt, desto höher die Bindekapazität der Proteinlösung. Der Farbstoff-Proteinkomplex kann bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch nachgewiesen

werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Bradford-Reagenz der Firma BIORAD (Tab. 2) eingesetzt. Als Proteinreferenz zur Erstellung einer Kalibrationsgeraden diente Rinderserumalbumin.
Ein Versuchsansatz enthielt 20 µL Bradford-Reagenz und 80 µL einer proteinhaltigen Probe (1-25 µg Protein pro mL).

2.17 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die mittlerweile gut etablierte Technik der Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet. Zur Dokumentation und Konservierung der Polyacrylamidgele wurden die in Tab. 7 aufgeführten Färbe- und Fixierlösungen eingesetzt.

Acrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Die eindimensionale denaturierende „sodiumdodecylsulfate-polyacrylamid-gelelectrophoresis (SDS-PAGE)“ dient der Auftrennung von Proteinuntereinheiten nach ihrem Molekulargewicht. Das Prinzip beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der SDS-beladenen Protein-Komplexe. Etwaige polare Seitenketten und Partialladungen der Untereinheiten werden durch das SDS abgeschirmt; sie verhalten sich im elektrischen Feld wie Anionen. Die relative Wanderungsstrecke der SDS-Protein-Komplexe steht mit dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte in linearer Beziehung. Die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels ist in Tab. 19 und Tab. 20 aufgeführt. Die Mengenangaben beziehen sich auf zwei Gele. Proben für ein SDS-PAGE wurden mit RotiLoad™ 4-fach konz. Ladepuffer (Tab. 2) versetzt und für ca. 3-5 min bei 95°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei RT und 10000 g. Zur Auftrennung wurden 10 µL der Probe in eine Geltasche eingebracht. Zum Größenvergleich und Auswertung der SDS-PAGE wurde als Größenmarker der Precision Plus Protein Standard All Blue™-Marker (Tab. 13) eingesetzt. Die Elektrophorese fand in einer speziellen Gelelektrophoresekammer (Tab. 1) bei 200 V und RT für 1 h statt.

Tabelle 14 Zusammensetzung des Sammelgels

Sammelgel 5 %ig	Volumen
Entionisiertes Wasser	2,9 mL
40 % (w/v) Acrylamid	500 µL
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	500 µL
SDS (10 %ig)	40 µL
APS (10 %ig)	40 µL
TEMED	4 µL

Tabelle 15 Zusammensetzung des Trenngels

Trenngel 12 %ig	Volumen
Entionisiertes Wasser	4,3 mL
40 % (w/v) Acrylamid	3,0 µL
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 µL
SDS (10 %ig)	100 µL
APS (10 %ig)	100 µL
TEMED	4 µL

2.18 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Der Einsatz von Oberflächenplasmonresonanz-Sensoren (SPR) erfolgt meist zur Analyse von biomolekularen Interaktionen. SPR-Sensoren gehören zu den optischen bzw. Evaneszenzfeldsensoren. Als evaneszentes Feld wird der physikalische Zustand bezeichnet, wenn Licht aus einem optisch dichteren Medium auf die Grenzfläche zu einem optisch dünneren Medium trifft. Hier ist die Lichtintensität jenseits der Grenzfläche trotz Totalreflektion des eingestrahlten Lichts nicht Null, sondern nimmt exponentiell ab. Diese Phase bezeichnet man als evaneszentes Feld. In der SPR-Messtechnik wird das optisch dichtere Medium mit einem dünnen Metallfilm versehen. Dieser ermöglicht eine Interaktion der Metallelektronen mit dem evaneszentem Feld im optisch dünneren Medium. Wird nun ein typischer SPR-Aufbau zugrundegelegt, so ist das optisch dichtere Medium ein Glasprisma, beschichtet mit einer Goldschicht. Das optisch dünnere Medium ist der Probenpuffer. Durch diesen Aufbau kann man nun die Interaktion von Biomolekülen im Puffer mit der Goldoberfläche bzw. darauf immobilisierten (Bio-Molekülen) untersuchen. Die Wechselwirkung der Elektronen mit dem evaneszentem Feld wird hierbei maßgeblich von der Konzentration, Form und Dichte der Biomoleküle beeinflusst und kann messtechnisch ausgewertet werden.

Das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte SPR-Spektrometer Plasmonic® der Firma HSS GmbH nutzt zur Lichteinstrahlung eine Laserdiode mit einer Wellenlänge von 786 nm, die Optik ist defokussiv. Hierbei wird die Strahlung der unterschiedlichen Einfallswinkel durch eine Zylinderlinse zwischen Laserdiode und Glasprisma auf verschiedene Positionen des Prismas projeziert.

Die Zylinderlinse ermöglicht die Strahlendivergenz innerhalb der Einfallsebene; hierbei werden alle potentiell möglichen Resonanzwinkel eingeschlossen. Mithilfe dieser Optik können alle Einfallswinkel ohne Verschiebung der Lichtquelle realisiert werden.

Die Detektion der reflektierten Strahlung erfolgt mit einer CCD-Kamera (760 x 560 Pixel), wobei das CCD-Array so aufgeteilt wird, das die reflektierte Strahlung aller 8 Messkavitäten mit dem gleichen Array winkelabhängig detektiert werden kann.

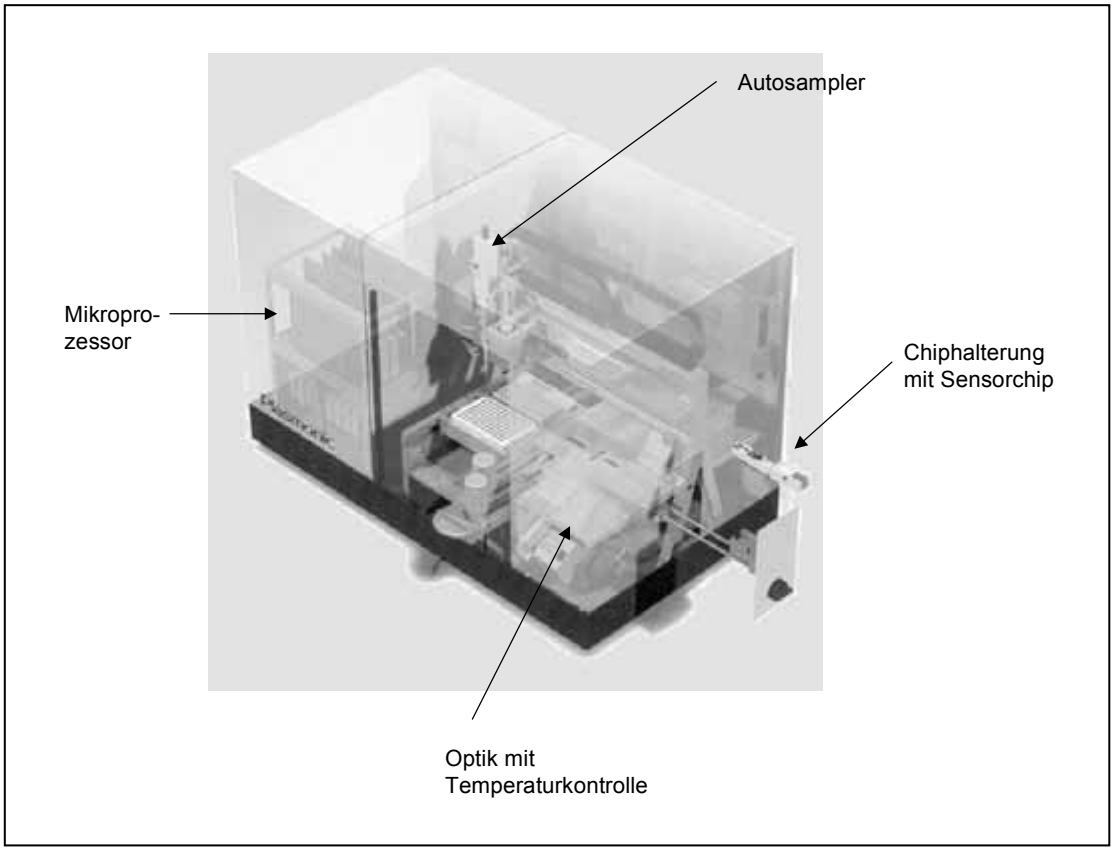


Abbildung 33 SPR-Gerät Plasmonic® der Hofmann Sensor Systeme GmbH.

Die Handhabung der Proben erfolgte durch den im Gerät eingesetzten Autosampler. Dieser wird durch den ebenfalls enthaltenen Mikroprozessor autonom nach vorheriger Programmierung gesteuert. Die Temperaturkontrolle der Proben erfolgte mithilfe von Peltierelementen, die eine Temperaturstabilität von 100 mKelvin aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde immer eine Arbeitstemperatur von 22,0°C gewählt. Die

Aufnahmefrequenz von Messpunkten ist beim Plasmonic® zwischen 0,01 und 2 Hz frei einstellbar, es wurde immer bei 1 Hz gearbeitet. Die bei der Messung eingesetzen Glasprismen waren 9 x 24 mm groß (Oberseite) und mit einer Goldschicht von ca. 100 nm bedampft. Zur Messung wurden die Goldprismen mit einer Oberflächenfunktionalisierung versehen und dann in die Chiphalterung eingesetzt. Zusätzlich wurden sie mit einer Kunststoff (PP)-Probenküvette mit 8 Kavitäten und einem Verdunstungsschutz (PE) versehen. Sämtliches Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial für das Plasmonic® wurden vom Hersteller HSS GmbH bezogen.

2.19 Magnetische Detektion mit Frequenzmischung

Die Detektion von superparamagnetsichen Teilchen wie z. B. Magnetic Beads kann mit verschiedenen Detektionssystemen erfolgen. Diese unterscheiden sich stark in den Bereichen Sensitivität, Gerätekomplexität und monetäre Umsetzbarkeit. Die von Herrn Dr. Krause am Forschungszentrum Jülich entwickelte und in dieser Arbeit eingesetzte Technik der Frequenzmischung ist auf eine möglichst einfache Handhabung bei gleichzeitig größtmöglicher Sensitivität ausgelegt. Frequenzmischung bedeutet, dass zwei Anregungsspulen mit unterschiedlichen Frequenzen ein gemeinsames Magnetfeld erzeugen. Hierauf reagieren die superparamagnetischen Magnetpartikel durch Magnetisierung. Ihre magnetische Reaktion auf diese Anregungsfelder kann man dann mit einer dritten Detektionsspule messen (KRAUSE ET AL., 2007).

Tatsächlich besteht der eingesetzte Magnet Reader aus 3 coaxialen Resonanzspulen, die um eine zentrale Bohrung von 8 mm Durchmesser zur Aufnahme der ABICAP®-Säulen angeordnet sind.

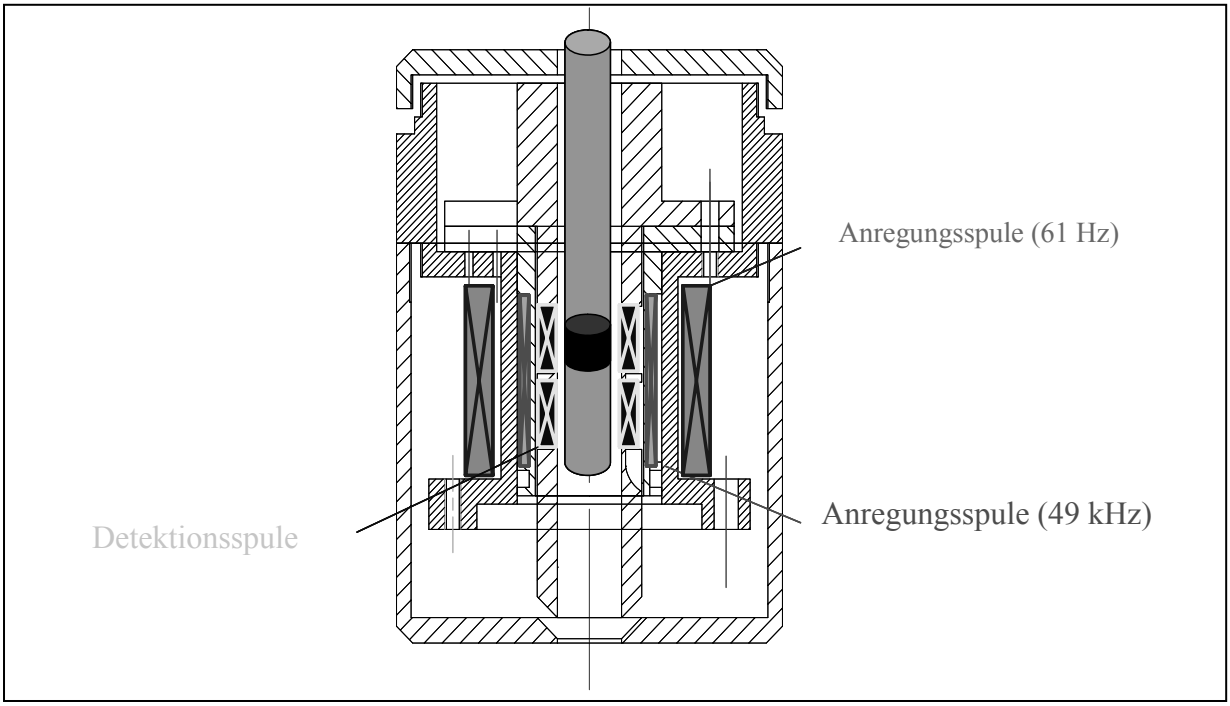


Abbildung 34 Schematische Darstellung des Sensorkopfes des Biomagnetreaders.

Die beiden Anregungsspulen erzeugen das magnetische Feld. Die Reaktion der Magnetpartikel auf die Anregung wird von der Detektionsspule gemessen. Hier werden zwei Detektionsspulen eingesetzt, eine auf Höhe des Polyethylensinterkörpers (schwarz), also am Ort der Immunreaktion und Markierung des Analyten mit den Magnetpartikeln. Zusätzlich ist eine weitere Detektionsspule direkt darunter angebracht. Diese bestimmt den Blindwert der Umgebung ohne Probe. Beide Messergebnisse werden noch im Gerät voneinander abgezogen.

Das Messprinzip beruht auf einer Anregung der in einer Probe enthaltenen Magnetpartikel durch die äußere Anregungsspule mit 61 Hz. Das erzeugte magnetische Feld hat eine Amplitude von wenigen Millitesla, ist aber ausreichend, um die in der Probe enthaltenen superparamagnetischen Partikel in ihre magnetische Sättigung zu treiben. Da es sich um ein alternierendes Feld (61 Hz) handelt, ist das magnetische Feld und damit die magnetische Sättigung der Partikel bei jedem positiven oder negativen Maximum der Feldamplitude am höchsten und die Partikel sind somit an diesen Punkten magnetisch gesättigt. Passiert die Magnetfeldamplitude aber den Nullpunkt, hat sie keinen Einfluss mehr auf die Magnetpartikel. Hier kommt der Einfluss der zweiten Anregungsspule (49 kHz) zum Vorschein. Normalerweise wird dieser von dem niederfrequenten Feld fast komplett überlagert, nur im Moment des Nullpunkts beim Phasenwechsel ist ein starker Einfluss dieses Feldes messbar.

Da das niederfrequente, erste Magnetfeld mit einer Frequenz f_2 (61 Hz) schwingt, ändern die Magnetpartikel ihre Magnetisierung demnach mit einer Frequenz von 2 x f_2 (122 Hz). Bei jeder Passierung des Nullpunkts ist der Einfluss des zweiten, hochfrequenten Magnetfeldes nun am höchsten und eine starke Magnetisierung der Partikel mit einer Frequenz f_1 von 49 kHz erfolgt. Das heißt, die Magnetisierung der in der Probe enthaltenen Magnetic Beads erfolgt permanent bei einer Frequenz von 49 kHz (f_1); diese magnetische Sättigung wird aber moduliert vom stärkeren niederfrequenten Magnetfeld f_2 mit einer Frequenz von 2 x f_2 bzw. 122 Hz. Liest man nun die magnetische Reaktion der Magnetpartikel aus, so stellt man fest, dass diese mit einer Frequenz von $f = f_1 \pm 2 \times f_2$ magnetisch oszillieren, es findet also eine Frequenzmischung der beiden Anregungsfelder statt. Da diese besondere Frequenz nur von den Magnetpartikeln stammt, ist kein Einfluss der Anregungsspulen auf die Detektionsspule feststellbar. Zusätzlich kann durch die Wahl der genutzen Frequenzen eine Störung durch bekannte Hintergrundfrequenzen ebenfalls minimiert werden.

Die tatsächlich gemessen Feldstärken bei dieser Frequenz ($f_1 \pm 2 \times f_2$) sind sehr gering; sie werden durch verschiedene Verstärkungsschritte in der Detektionsspule und in der Hardware erhöht, demoduliert und durch Rauschfilter möglichst sauber aufbereitet, bevor sie dann als abstraktes Millivolt-Signal von der Software des Magnet Readers ausgegeben werden.

2.20 Assays auf Basis der magnetischer Detektion mit ABICAP® Säulen

Die magnetische Detektion mit ABICAP® Säulen war das am häufigsten eingesetzte Messsystem dieser Arbeit. Das ABICAP® System besteht aus kleinvolumigen Chromatographiesäulen und dreidimemsionalen, porösen Polymerkörpern aus gesintertem Polyethylen mit definierten Porengrößen. Die Polyethylensinterkörper haben eine zylindrische Form mit jeweils 5 mm Höhe und Durchmesser (Volumen 98,2 mm³). Der Durchmesser der Sinterkörper ist so bemessen, dass er exakt in die zugehörige Chromatographiesäule aus Polycarbonat eingesetzt werden kann. Nach Einsetzen des Sinterkörpers bleibt der Chromatographiesäule ein Restvolumen von ca. 750 µl, das der Aufnahme von Reagenzien dient. Diese passieren nur mithilfe der Schwerkraft den Polyethylensinterkörper. Das Verfahren ist somit eine dreidimensionale Immunofiltration. Zur einfacheren Handhabung wurden die Säulen in einer ABICAP®-Arbeitsstation eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen Setzrahmen in dem die Säulen eingehängt

werden; zusätzlich werden durchgelaufene Reagienzen in einem Auffangbehälter zurückgehalten.

Zur Durchführung von Assays wurden Säulen mit entsprechend immobilisierten Biomolekülen in die ABICAP® Arbeitsstation eingesetzt und mit Messpuffer gespült (i. d. R. 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3). Bei der weiteren Durchführung muss zwischen der sequentiellen Technik und magnetischer Extraktion unterschieden werden.

2.20.1 Sequentielle Messtechnik

Bei der sequentiellen Technik wurde die Probe mit dem zu detektierenden Analyten in Messpuffer, Serum oder anderen Matrices mit einem Volumen von 500 µl in die Chromatographiesäule einpipettiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten hatte die Flüssigkeit die Säule garantiert passiert und es wurde wieder mit Messpuffer gespült. Nun folgte die Zugabe der Magnetic Bead-Lösung.

Diese Lösung wurde im Vorfeld durch Blindsäulen filtriert. Das heißt, eine Lösung mit 250 µg/ml Magnetic Beads in Messpuffer mit 10% (v/v) Caseinpuffer wurde angesetzt und durch unbehandelte Chromatographiesäulen mit Polyethylensinterkörpern geleitet. Hierbei wurden alle größeren (Fremd)-Partikel und Beads mit nicht abreagierten Oberflächen abgetrennt. Die filtrierte Beadlösung ist dann mit dem Detektions- bzw. Markierungsantikörper versetzt worden. Dieser hatte eine Biotin-Funktion, die Kopplung an die Magnetic Beads erfolgte über eine Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung. Zu diesem Zweck wurden Magnetic Beads mit einer Streptavidin-Oberfläche eingesetzt. Diese Magnetic Bead-Lösung wurde anschließend mit einem Volumen von 500 µl durch die Chromatographiesäulen geleitet und für 30 Minuten inkubiert. Abschließend erfolgten zwei Waschschritte mit 700 µl Messpuffer. Diese Säulen wurden dann in den Messkopf des Biomagnetreaders eingesetzt. Zur Bestimmung des Messwertes wartete man ca. 5 Sekunden, bis ein stabiles Signal am Multimeter ablesbar war. Zur Auswertung wurde bei Verwendung des Prototyp-Messkopfes ein gerätspezifischer Leerwert von 150 mV abgezogen. Der ebenfalls verwendete integrierte Messaufbau bestimmte seinen Leerwert automatisch, sodass bei Verwendung dieses Gerätes das abgelesene Signal direkt verwendet werden konnte.

2.20.2 Kombinierte magnetische Extraktion und Detektion

Zur magnetischen Extraktion wurde die Probe, das heißt Analyt in Puffer oder Matrix, direkt mit 250 µg/ml Magnetic Beads und biotinyliertem Markierungsantikörper versetzt. Die Probe wurde gut durchmischt und für 1 Stunde schüttelnd (200 U/min) inkubiert. Zur magnetischen Extraktion wurden die Reaktionsgefäße einfach in Magnetständer eingesetzt. Diese sind mittlerweile von mehreren Herstellern für alle Typen von Reaktionsgefäßen erhältlich und extrahieren die Magnetpartikel über Neodym-Magneten, die an der Aussenwand der eingesetzen Reaktionsgefäße positioniert sind. An dieser Stelle werden die Magnetic Beads fixiert und die im Reaktionsgefäß enthaltene Flüssigkeit (Puffer oder Matrix) konnte nun mit einer Pipette abgetrennt werden. Die Magnetic Beads wurden anschließend im gleichen Volumen an Messpuffer (0,15 M PBS-Puffer pH 7,3) mit 10 % (v/v) Caseinpuffer resuspendiert und jeweils 500 µl in die ABICAP®-Säulen einpipettiert. Die magnetisch extrahierten Magnetic Beads durften dabei auf keinen Fall an- oder eintrocknen. Auf der Säule wurde die Lösung für weitere 30 Minuten inkubiert und anschließend mit zweimal 700 µl Messpuffer gespült. Abschließend erfolgte das Einsetzen in den Messkopf des Magnet Readers und Ablesen des nach einigen Sekunden stabilen Messwertes.

2.20.3 Bestimmung der Standardabweichungen eines Assays

Die interne Standardabweichung eines Assays ist eine wichtige Leistungsgröße uns gibt die Genauigkeit und Verlässlichkeit eines Systems wieder. Zur Bestimmung der internen Standardabweichung gibt es verschiedene etablierte Verfahren; für die vorliegende Arbeit wurde der typische Intra-Assay verwendet.

Hierzu testet man 4 Proben, z. B. den Blindwert, eine kleine, mittlere und eine hohe Analytenkonzentration mit einer Vielzahl von Einzelmessungen. In der Regel wurden 12 Proben einer Konzentrationsstufe vermessen. Hieraus erhält man 4 Standardabweichungen für den Blindwert und die drei Konzentrationsstufen. Der Mittelwert dieser 4 Standardabweichungen ist dann die Gesamtabweichung des Assays.

Oftmals ist die Standardabweichung des Blindwerts und der niedrigen Analytenkonzentration höher als die der höheren Analytenkonzentrationen. Dies ist häufig dadurch verursacht, dass ein fixes Grundrauschen des Messystems bei kleineren Messignalen sich deutlich stärker auswirkt als bei hohen Messsignalen.

2.21 Magnetische Detektion mit kombinierter Fluidik

Im Rahmen der Charakterisierung und Weiterentwicklung des Prototyp-Messkopfes wurde auch der Probendurchsatz mit einem fluidischen System getestet. Hierbei erfolgte die magnetische Detektion wie in Kap. 2.20. Der in dieser Arbeit verwendete Prototyp des Magnet-Readers ist, anders als die nachfolgenden Entwicklungsstufen, auch für den Durchflussbetrieb geeignet. Da Messkopf und Auswertelektronik jeweils einzeln realisiert wurden und das untere Ende der Säulenaufnahme im Messkopf ebenfalls offen ist, bot sich die Etablierung eines einfachen fluidischen Systems an. Hierzu wurde der Messkopf an einem Stativ montiert und konnte so die jeweilige Messsäule aufnehmen. Die Messsäulen wurden mit einem Einfüll- und Ablaufschlauch versehen (siehe schematische Darstellung in Abb. 35). Der Transport der Flüssigkeiten erfolgte mit einer Gilson-Pumpe.

Die Aufnahme und Auswertung des Messsignals erfolgte durch Kopplung des Sensors-Multimeterausgangs mit einem A/D-Wandler und PC samt zugehöriger Auswertesoftware (Eurochrom).

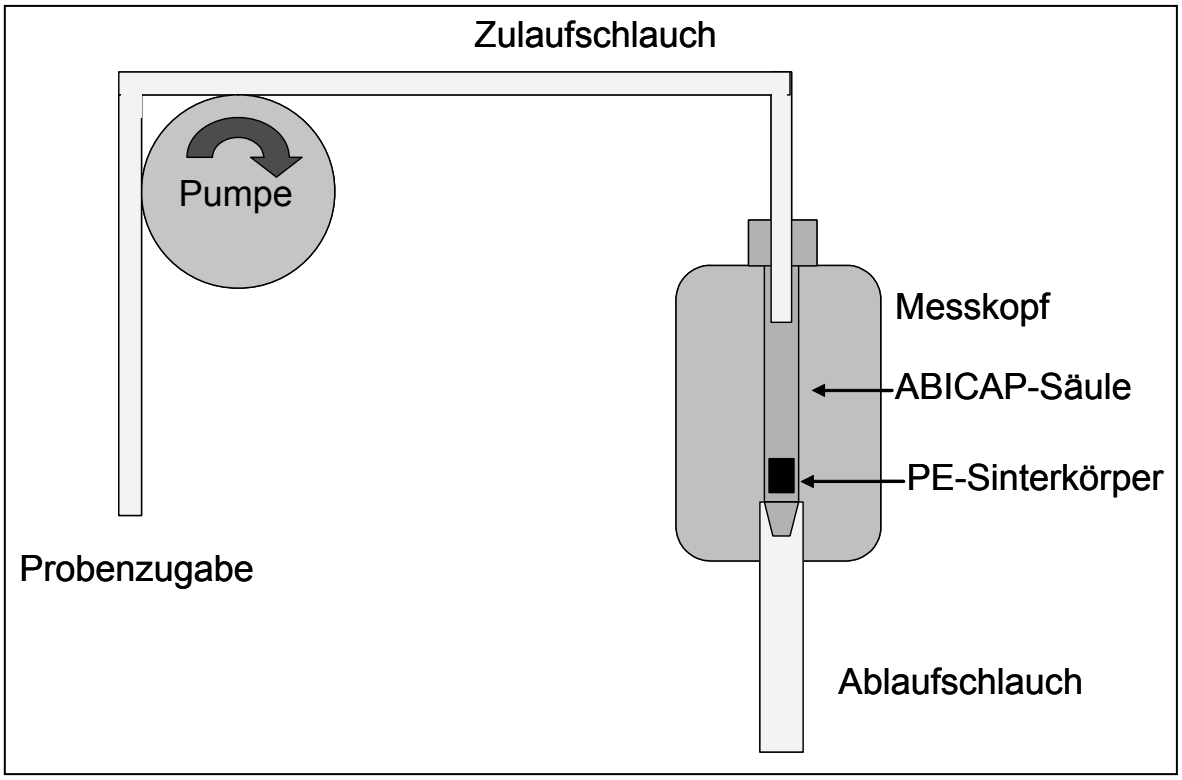


Abbildung 35 Schematische Darstellung des Fluidik-Messaufbaus.

Abbildung 36 Aufbau der Fluidik. Man erkennt links Pumpe, Schlauch und Messkopf. Links neben dem Monitor befindet sich der A/D-Wandler.

Die Herstellung der Messsäulen erfolgte wie bereits beschrieben. Hierbei wurde der Extraktionsantikörper immobilisiert und anschließend die Polymeroberfläche mit Caseinpuffer zur Vermeidung unspezifischer Bindungen blockiert. Die fertig beschichteten Säulen wurden an den Zu- und Ablaufschlauch gekoppelt und in den Messkopf eingesetzt. Jede Messsäule konnte nur für eine Messung verwendet werden.

Zur Probenvorbereitung wurde der Analyt in 500 µl 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 oder einer anderen Probenmatrix dotiert und anschließend mit Magnetic Beads (1:100 v/v) und Detektionsantikörper versetzt. Diese Lösung wurde durchmischt und für 1 Stunde schüttelnd inkubiert. Im Folgenden konnte die Lösung direkt verwendet werden oder durch einen magnetischen Extraktionsschritt zusätzlich aus einer Probenmatrix in Messpuffer (0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 mit 1:10 v/v Caseinpuffer) überführt werden. Hierzu wurde wiederum ein magnetischer Ständer eingesetzt.

Die Messung erfolgte nach einer 2 minütigen Konditionierung der Messsäule mit 0,15 M PBS-Puffer. Hierzu wurde die Magnetic-Bead-Lösung einfach über die Säule gepumpt und

anschließend für mehrere Minuten mit PBS-Puffer gespült. Das detektierte Signal wurde direkt vom Computer aufgezeichnet und konnte im Anschluss ausgewertet werden. Hierbei wurde der Signalzuwachs zwischen Messbeginn und Messende verwendet.

2.22 Detektion des C-reaktiven Proteins auf Polystyrolchips

Zur Überprüfung und qualitativen Bestimmung der Immobilisierungstechniken auf Polystyrol wurde ein Testsystem zur Bestimmung des humanen C-reaktiven Proteins (CRP) verwendet. Die Detektion dieses wichtigen Blutmarkers erfolgte im Sandwich-Prinzip; das heißt es wurden unterschiedliche Antikörper zur Extraktion und Markierung des Proteins verwendet.

Der gesamte Assay wurde auf den modifizierten Polystyrolchips ausgeführt und ausgewertet.

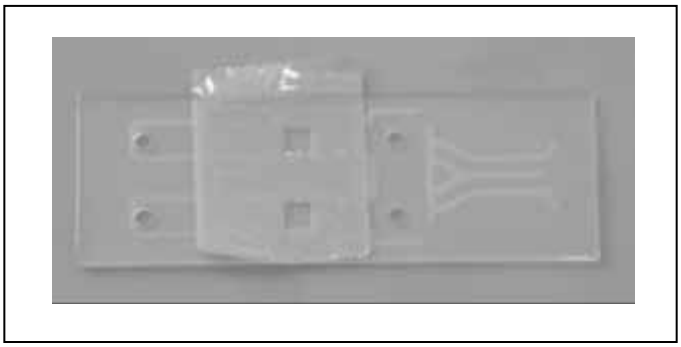


Abbildung 37 Polystyrolchip zur Immobilisierung.
Die Messpunkte (2x2 mm) sind mit Prozessklebeband maskiert. Die seitlich vorhandenen Löcher und Riefen sollen in späteren Entwicklungsstufen Teil einer Mikrofluidik werden. Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Boehringer Ingelheim microParts.

Der erste Antikörper, anti-CRP C2, wurde zum extrahieren und immobilisieren des CRPs aus der Pufferprobe verwendet. Hierzu ist dieser Antikörper mit den verschiedenen, oben beschriebenen Techniken auf der Polystyrol-Oberfläche immobilisiert worden. Anschließend erfolgte das Abziehen der Maske und eine Blockierung der restlichen freien Bindungsstellen und teilweise eine Trocknung des Chips. Zur Messung wurden die Chips mit Messpuffer PBS (0,15 M, pH 7,3) gespült bzw. rehydriert. Die Probe bestand aus CRP mit einer Konzentration von 400 ng/ml verdünnt in Messpuffer. Diese wurde auf die Messpunkte des Chips aufpipettiert und kam dabei mit dem Markierungsantikörper in

Kontakt. Hierbei handelte es sich um den anti-CRP C6 Antikörper mit einer Fluoreszenzmarkierung. Die Konzentration dieses markierten Antikörpers betrug 10 µg/ml in Messpuffer. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde der Chip wieder mit Messpuffer gespült und feucht in ein Fluorezenz-Spektroskop eingelegt. Die Fluoreszenz der Messpunkte konnte nun bestimmt werden. Je nachdem, wie effizient die Immobilisierungsmethode für den anti-CRP C2 Antikörper war, umso mehr CRP wurde dementsprechend auf den Messpunkten gefangen und konnte dann mit dem zweiten Antikörper anti-CRP C6 fluoreszenzmarkiert werden.

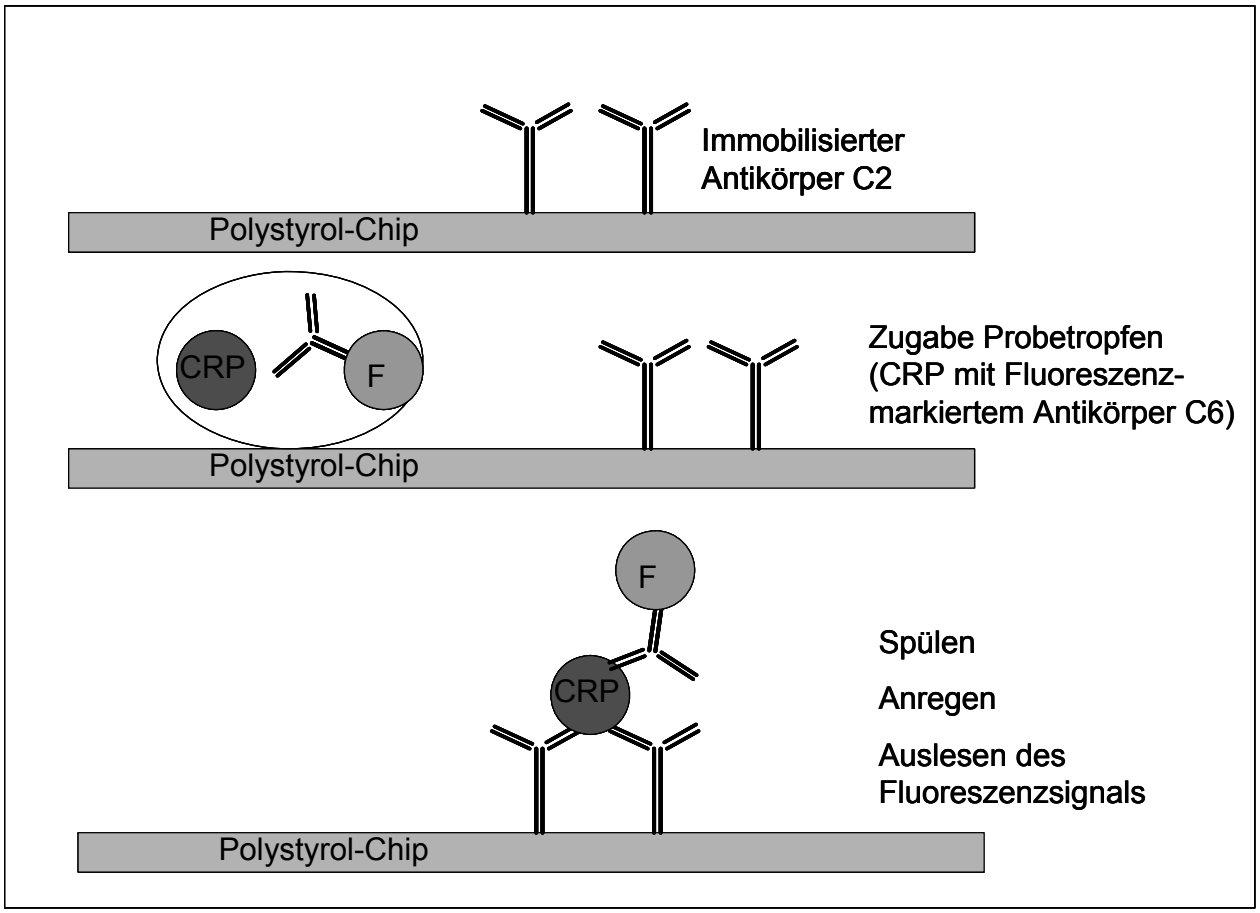


Abbildung 38 Schematische Darstellung des CRP-Assays auf Polystyrolchips.

Für die Durchführung der Messung nach Bereitstellung der modifizierten Chips danke ich Frau Dr. Müller-Chorus, Boehringer Ingelheim microParts.

2.23 Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten nach EDWARDS UND LEATHERBARROW (1997)

Die Methodik der Bestimmung einer Assoziations- und Dissoziationskonstanten zwischen zwei Biomolekülen in SPR-basierten Messanordnungen ist von EDWARDS UND LEATHERBARROW (1997) beschrieben worden. Nach Bestimmung der Assoziationskonstante k_{ass} und der Dissoziationskonstante k_{diss} aus experimentellen Daten ist nach Gleichung 1 auch eine mathematische Ermittlung des K_D-Wertes möglich.

Gleichung 1 $K_D = k_{diss} / k_{ass}$

Zur Ermittlung der Assoziationskonstanten werden die initialen Bindungsraten der zu vermessenden biomolekularen Interaktion bestimmt. Bei Auftragung der konzentrationsabhängigen intialen Bindungsraten gegen die zugehörige Konzentration des Liganden ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Die Ausgleichsgerade dieser graphischen Bestimmung enthält als Steigung das Produkt aus k_{ass} und der maximal möglichen absoluten Bindung R_{max}. Auch R_{max} kann experimentell ermittelt werden, wodurch die Assoziationskonstante k_{ass} aus der Steigung der Ausgleichgerade mathematisch zugänglich wird. Bei der Bestimmung von R_{max} handelt es sich um eine Näherung; diese wird erreicht wenn eine Konzentrationserhöhung des Liganden zu keinem weiteren Anstieg des absoluten Signals führt.
Zur Ermittlung der initialen Bindungsraten wurden die ersten 10 Sekunden der SPR-Messung nach Zugabe des Liganden ausgewertet. Es handelt sich also um die initiale Bindung des Liganden an an den immobilisierten Interaktionspartner. Die Einheiten der initialen Bindungsrate für die weitere mathematische Bestimmung sind AU/s; die Konzentration des Liganden wird in nM eingesetzt.

Die Dissoziationskonstante k_{diss} wird aus der Dissoziation von Ligand und immobilisiertem Interaktionspartner bei Pufferzugabe bestimmt. Hier gilt Gleichung 2

Gleichung 2 $R_t = (R_0 - R_\infty)^{(-k_{diss} \cdot t)} + R_\infty$

Hierbei steht R_t für das gemessene Signal zum Zeitpunkt t, R_0 für das Anfangssignal bei Beginn der Dissoziation (Pufferzugabe) und R_∞ für das Endsignal nach mehrmaligen spülen der Messküvette. Durch Umformung erhält man aus Gleichung 2 die Gleichung 3.

Gleichung 3 $$k_{diss} = [- \ln (R_t - R_\infty) / (R_0 - R_\infty)] / t$$

Somit kann die Dissoziationskonstante k_{diss} zum Zeitpunkt t (Beginn der Dissoziation) mithilfe von Gleichung 3 berechnet werden. Als Endsignal R_∞ wurde der stabile Endwert des Messignals nach mehrmaligen spülen der Messküvette mit Puffer bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Biosensors zur Analytik des C-reaktiven Proteins (CRP) auf Basis der Oberflächenplasmonresonanz

3.1.1 Messanordnung

Bei diesem Typ von Sensoranalytik wurde die Immunreaktion der anti-CRP Antikörper Klon C2 und C6 ausgenutzt. Beide Antikörper haben unterschiedliche Epitope an dem Pentamer CRP. Diese Eigenschaft macht die Nutzung eines „Sandwich"-Prinzips möglich. Das CRP wird hierbei mit einem Antikörper eingefangen und durch einen zweiten Bindungsvorgang visualisiert. Dies kann z. B. ein markierter Antikörper sein. Da die Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR) eine optische Auflösung von Molekülen erlaubt, konnte auf den Einsatz eines markierten Antikörpers verzichtet werden, die immunbasierte Bindungsreaktion des zweiten Antikörpers an der präsentierten Oberfläche reicht zur Auswertung aus.

Die Messung erfolgte auf Glasprismen mit einer definierten Goldoberfläche. Auf die Goldoberfläche wurde im Vorfeld Biotin immobilisiert. In Abbildung 39 ist das entsprechende Messprinzip vorgestellt.

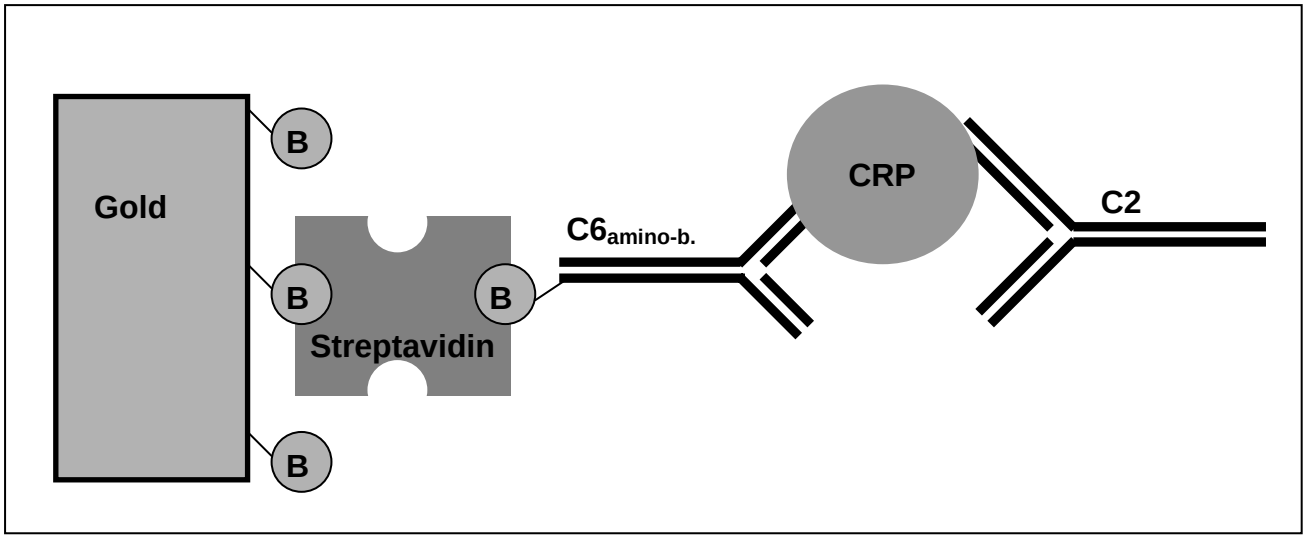


Abbildung 39 Darstellung der Messanordnung für SPR-Analysen.
B=Biotin, immobilisiert auf der Goldoberfläche. Das Protein Streptavidin dient als Verbindungselement zwischen der Biotinoberfläche und dem biotinyliertem antiCRP Antikörper Klon C6. Das gefangene CRP wird durch den antiCRP Antikörper Klon C2 markiert.

Im Zuge jeder Messung wurde zuerst Streptavidin in die SPR-Küvette und somit auf die Goldschicht gebracht. Dieses bindet aufgrund der bekannten Biotin-Streptavidin-Interaktion an das auf der Oberfläche immobilisierte Biotin. Streptavidin hat vier Bindungsdomänen für Biotin; nach Kopplung an die Oberfläche stehen also immer noch mehrere Bindungstaschen für biotinylierte Moleküle zur Verfügung. Streptavidin erfüllt somit die Funktion eines multi-kopplungsfähigen Spacers.

An das immobilisierte Streptavidin wurde nun nach einen Waschschritt mit 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 der biotinylierte Antikörper antiCRP Klon C6 gebunden. Im Zuge der Optimierung konnten verschiedene Biotinylierungsformen verglichen werden.

Nach Kopplung des Antikörpers wurde wiederum gewaschen und anschließend alle freien Bindungsstellen mit BSA-Lösung (0,15%) blockiert. Nach einem weiteren Waschschritt erfolgte die Antigen (CRP)-Zugabe. Diese erfolgte ebenfalls in PBS-Puffer der gleichen Molarität, um etwaige Effekte der Salzkonzentration auf den Brechungsindex auszuschliessen. Im Anschluß an diesen Schritt wurde erneut gewaschen und dann der Detektionsantikörper in die Küvette einpipettiert. Hierbei zeigte sich eine von der vorher eingebrachten CRP-Konzentration abhängige Bindungskinetik des Antikörpers antiCRP Klon C2 an die Oberfläche. Nach einem finalen Waschschritt konnte die Winkelveränderung, bedingt durch die antiCRP Klon C2-Bindung, als Messgröße für die CRP-Konzentration, bestimmt werden. Abbildung 40 zeigt beispielhaft ein SPR-Sensogramm der dargestellten Messanordnung.

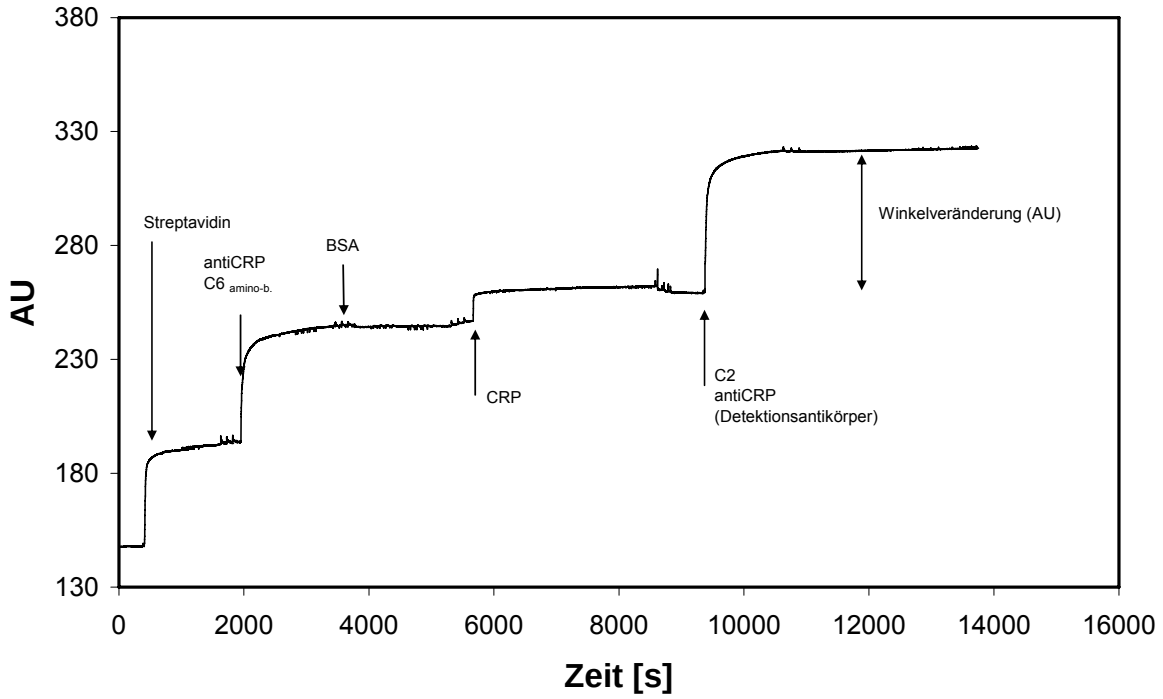


Abbildung 40 **SPR-Sensogramm der Messanordnung**. (Streptavidin 250 µg/ml, Antikörper antiCRP C6 und C2 jeweils 100 µg/ml, CRP 75 µg/ml, BSA 150 µg/ml).

In Abbildung 40 sind die Winkelverschiebungen bei jedem Inkubationsschritt dargestellt. Anhand der kinetischen Bindungskurven lässt sich die Anlagerung der Proteine sehr gut verfolgen. Nach jedem Inkubationsschritt erfolgte ein Waschschritt mit PBS-Puffer, bei dem das gesamte Küvettenvolumen insgesamt zweimal in vier Schritten ausgetauscht wurde. Dies ist durch die teilweise sichtbaren „Spikes“ vor jeder neuen Anlagerung nachvollziehbar. Durch die Einbringung einer BSA-Lösung (150 µg/ml in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3) in die Küvette sind alle frei gebliebenden Bindungsstellen der Goldoberfläche blockiert worden. Hierdurch soll eine unspezifische Bindung von CRP und Detektionsantikörper an die Oberfläche verhindert werden. Ausgewertet wurde die durch den antiCRP Antikörper C2 ausgelöste Winkelverschiebung (ΔAU) im letzten Schritt nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten.

3.1.2 Optimierung der Messanordnung

Zur Optimierung der Detektion erfolgte ein Vergleich zwischen Carboxy- und Aminoterminal-biotinylierten Antikörpern (antiCRP Klon C6). Wie in Abbildung 41 dargestellt, hatte der Carboxyterminal-biotinylierte Antikörper eine um 40% geringere Bindungskapazität.

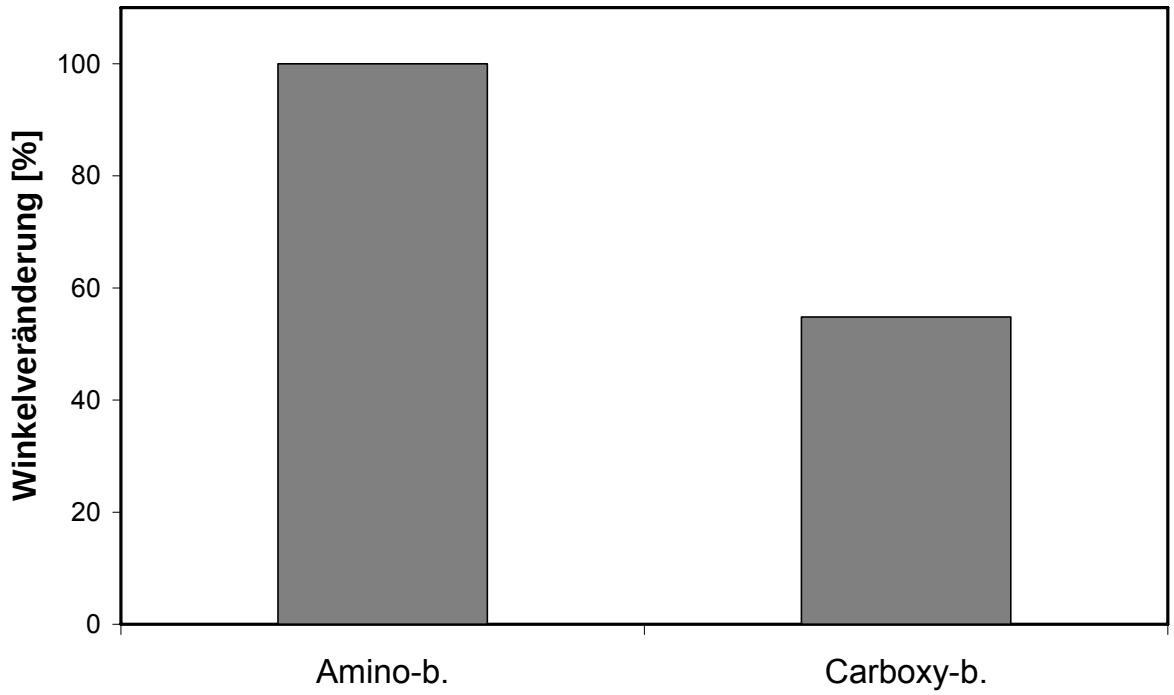


Abbildung 41 **Vergleich zwischen Carboxy- und Aminoterminal-biotinyliertem Antikörper anti-CRP Klon C6.** Die Bindungskapazität des Aminoterminal-biotinylierten anti-CRP Klon C6 wurde als 100 % definiert, (n=2).

Ein weiterer optimierter Parameter innerhalb dieser Messanordnung war die Konzentration des Detektionsantikörpers (antiCRP Klon C2). Hierbei stellte sich eine Konzentration von 100 µg/ml antiCRP Klon C2 als am besten heraus. Diese Konzentration wurde in allen weiteren Versuchen beibehalten.

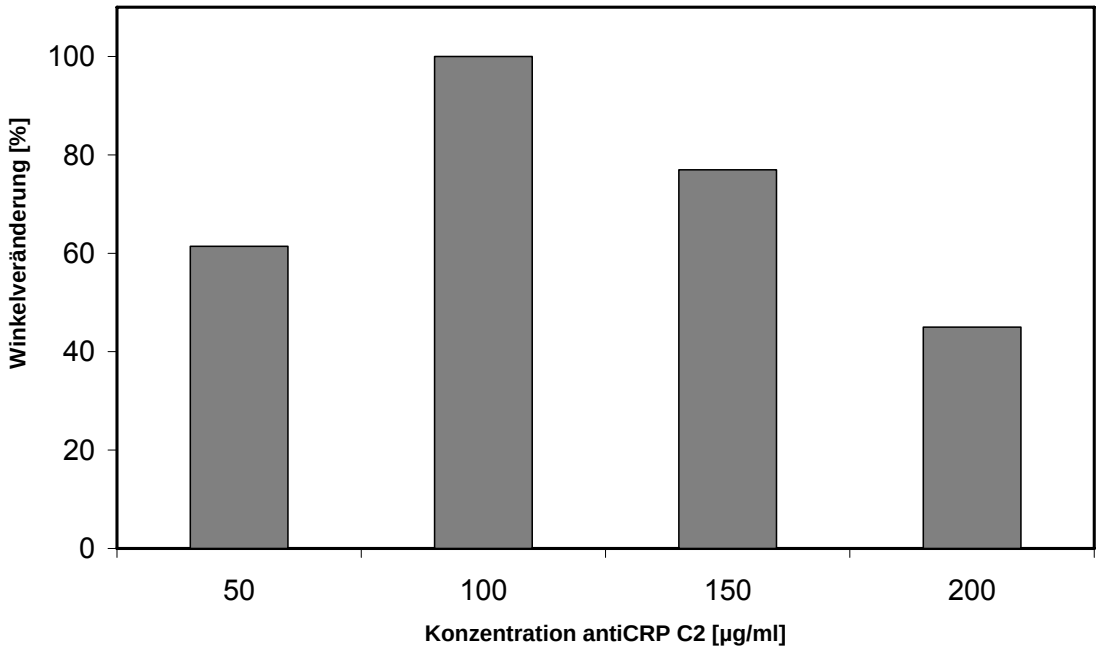


Abbildung 42 Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen des Detektionsantikörpers antiCRP Klon C2. Die maximale Winkelveränderung wurde als 100% definiert, (n=2).

Nach erfolgreicher Optimierung der Messanordnung wurden verschiedene CRP-Konzentrationen in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 vermessen. Die folgenden Parameter wurden bei allen Messungen eingehalten: Streptavidin 250 µg/ml, Antikörper antiCRP Klon C6 (aminoterminal-biotinyliert) 100 µg/ml, BSA 150 µg/ml, Detektionsantikörper antiCRP Klon C2 100 µg/ml. Die Temperatur betrug konstant 22,0°C.

3.1.3 Etablierung des CRP-Immunosensors

Zur Bestimmung einzelner CRP-Konzentrationen und zur Etablierung eines Immunosensors zur CRP-Detektion wurden Messungen mit den als optimal ermittelten Parametern durchgeführt. Die hierbei aufgezeichneten Winkelveränderungen durch die Anlagerung des Detektionsantikörpers antiCRP C2 sind in Abbildung 43 graphisch dargestellt.

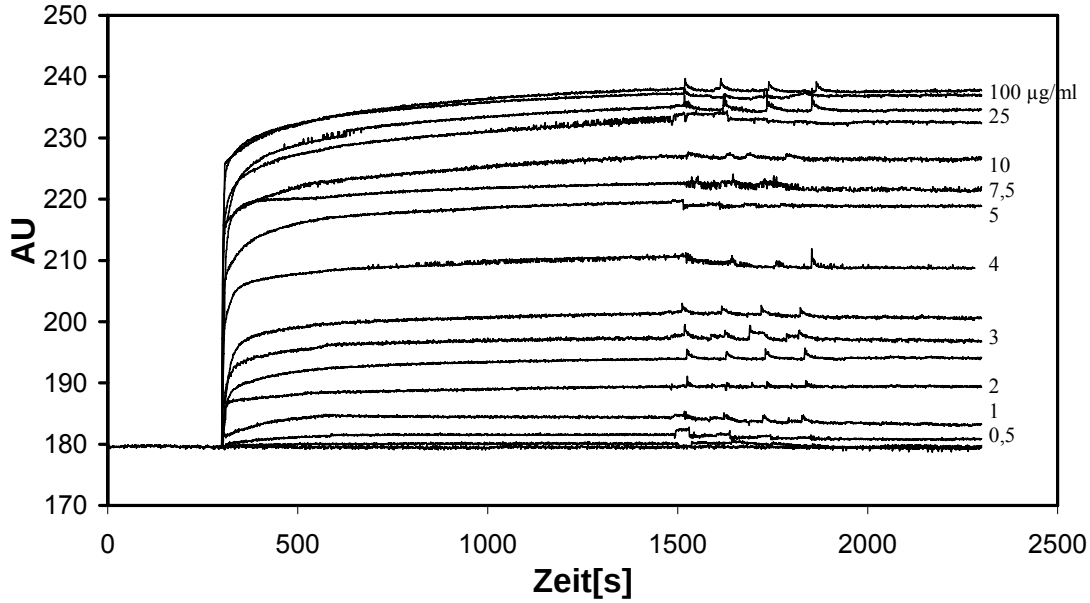


Abbildung 43 Graphische Darstellung der Winkelveränderung durch Anlagerung des Detektionsantikörpers antiCRP Klon C2 bei verschiedenen CRP-Konzentrationen.

Wie in Abbildung 43 dargestellt, wurde die Winkelverschiebung zwischen Basislinie und Endwert der Anlagerung gemessen. Der Endwert der Anlagerung wurde nach 20-minütiger Inkubation und anschließendem 4-fachem Waschschritt mit PBS-Puffer erreicht. Der 20-minütige Inkubationszeitraum konnte als Ergebnis einer Langzeitmessung von 2 Stunden ermittelt werden. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten waren mehr als 95% des maximalen Zuwachses erreicht.

In Abbildung 44 ist die Auswertung der Winkelverschiebungen [ΔAU] dargestellt; alle Messungen wurden mindestens dreifach zur Bestimmung der Standardabweichungen ausgeführt.

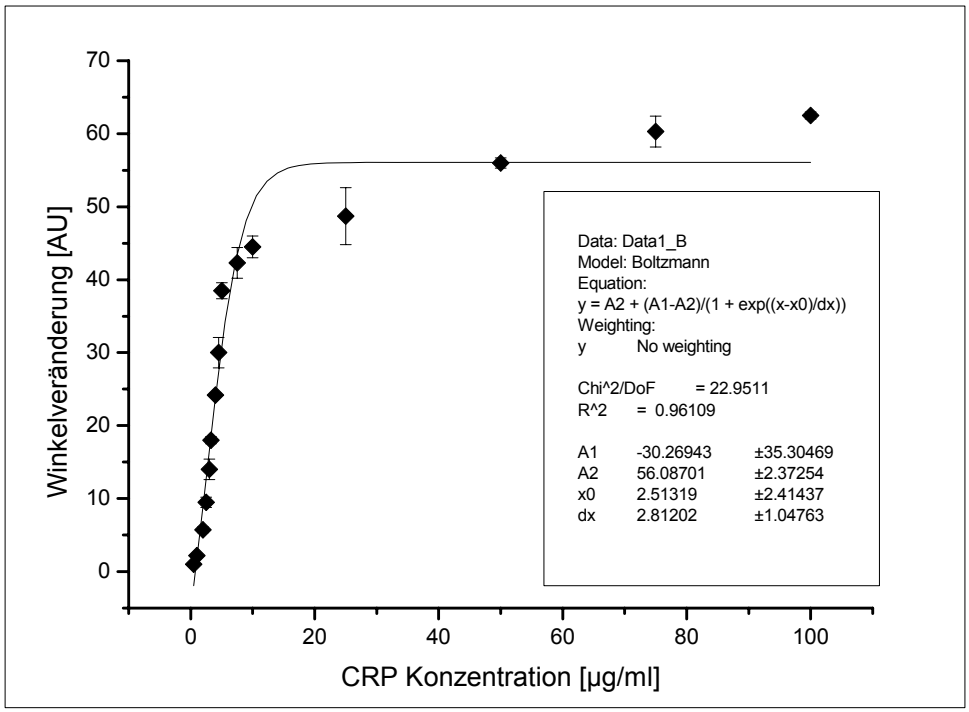


Abbildung 44 Darstellung der Winkelveränderungen bei der Vermessung verschiedener CRP Konzentrationen.

Wie viele Immunreaktionen folgt auch diese Darstellung einer Konzentrationsabhängigkeit einem sigmoiden Kurvenverlauf (siehe Boltzmann-Fit). Zur Etablierung eines Biosensors für die CRP Analytik ist ein linearer Messbereich notwendig. Hierzu ist der lineare Bereich zwischen 2 und 5 µg CRP pro ml weiter ausgewertet worden (siehe Abbildung 45).

Der lineare Messbereich von 2 bis 5 µg/ml CRP ermöglicht eine CRP-Analytik im für die humane Blutserum-Diagnostik wichtigen Bereich von 0 bis 50 µg/ml CRP. Das humane C-reaktive Protein tritt als Entzündungsmarker oft in kleinen Konzentrationen (~1 µg/ml) im Blutserum auf. Ab einer Konzentration von 50 µg/ml spricht man von einem Alarmwert.

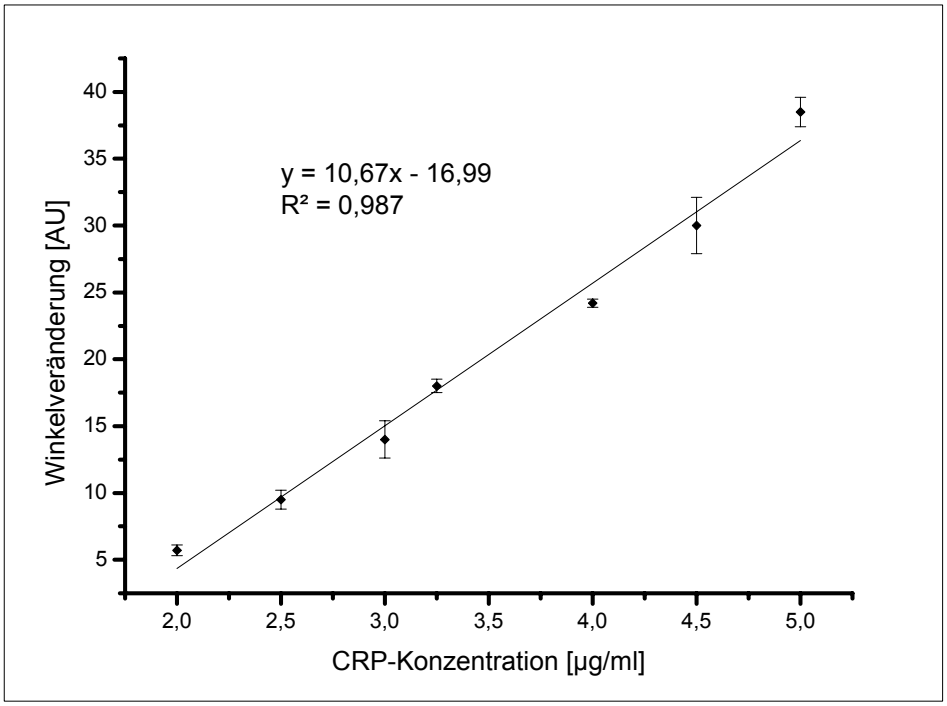


Abbildung 45 Linearer Messbereich des CRP Biosensors auf SPR-Basis.

3.1.4 Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstante der Antikörper antiCRP Klon C2 mit Oberflächenplasmonresonanz

Die Etablierung eines Biosensors zur CRP-Analytik auf SPR-Basis ermöglichte durch die große Anzahl von Messungen bei verschiedenen CRP-Konzentrationen auch eine Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten des Detektionsantikörpers antiCRP Klon C2. Die Bestimmung der Konstanten erfolgte nach einer Vorschrift von EDWARDS UND LEATHERBARROW (1997). Die Assoziationskonstante (k_{ass}) wurde hierbei zuerst graphisch bestimmt (Abb. 46).

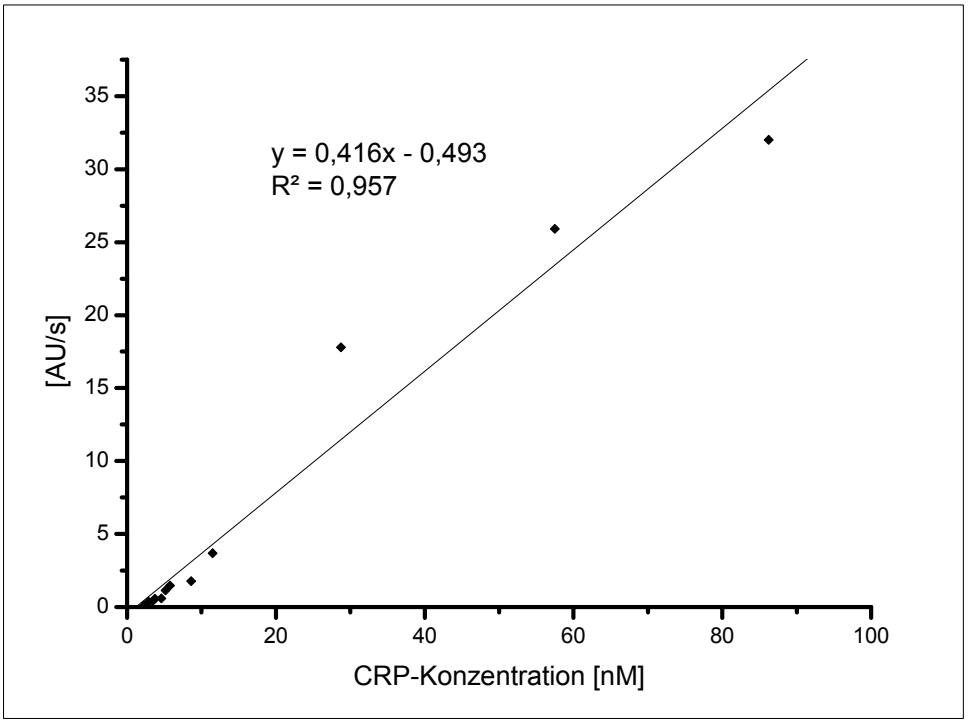


Abbildung 46 Graphische Ermittlung der Assoziationskonstante kass.

Als maximaler Zuwachs (ΔAU) bzw. R_{max} wurde ein Wert von 62,5 AU ermittelt. Die Bestimmung der Assoziationskonstante erfolgte mithilfe der Formel:

Gleichung 4 $k_{ass} = M_{\text{Steigung der Ausgleichsgerade}} / R_{max}$

Somit ist $k_{ass} = 0{,}416 / 62{,}5$ [$s^{-1}*nM^{-1}$] bzw. $6{,}6 \times 10^6$ $s^{-1}*M^{-1}$.

Die Gleichung 3 ermöglicht die mathematische Bestimmung der Dissoziationskonstante k_{diss}. Als notwendige Parameter wurden $R_\infty = 237{,}5$ AU, $R_0 = 238{,}69$ AU und $R_t = 238{,}1$ bei t = 60 s. Die Dissoziationskonstante k_{diss} beträgt:

$k_{diss} = 4{,}779\ s^{-1}$.

Beide Konstanten werden zur Bestimmung von k_D benötigt. Hier gilt die Formel $k_D = k_{ass} / k_{diss}$ (Gleichung 1). Die mathematische Bestimmung von k_D ergibt also folgenden Wert:

$k_D = 1{,}39 \times 10^6\ M^{-1}$.

3.2 Immobilisierung des antiCRP Antikörpers Klon C2 auf Polystyrol

Zur weiteren Verwendung des CRP-Antikörper-Systems auf anderen Detektionssystemen wurde die Immobilisierungsfähigkeit des anti-CRP Klon C2 auf Polystyrol untersucht. Hierzu wurde der aus Kapitel 3.1 bekannte Assay übertragen. Der Antikörper anti-CRP C6 war zu diesem Zweck fluoreszenzmarkiert; die Menge an gebundenem anti-CRP C6 – Antikörper und somit die Menge an immobilisiertem Antikörper konnten somit in einem Fluoreszenzspektroskop ausgelesen werden.
Da Vergleichswerte zur Immobilisierung dieses Antikörpers auf Polystyrol fehlen, erfolgte eine Auswertung nur qualitativ.

Von jedem Messpunkt (2x2 mm) wurden Fluoreszenzaufnahmen gemacht und ausgewertet. Zusätzlich wurden zu jeder Beschichtungsmethode Blindproben ohne immobilisierten anti-CRP C2 Antikörper durchgeführt. Abbildung 47 zeigt eine typische Auswertung des CRP-Assays auf Polystyrol. Um alle Messungen direkt miteinander vergleichen zu können, wurde ein Punktesystem zur qualitativen Beurteilung der Immobilisierungsausbeute eingesetzt. Hierbei steht „+++“ für ein optimales Ergebnis, „++“ für ein gutes Ergebnis, „+“ für eine zufrieden stellende Immobilisierungsausbeute und „-“ für ein mangelhaftes oder sinnloses Immobilisierungsverfahren.

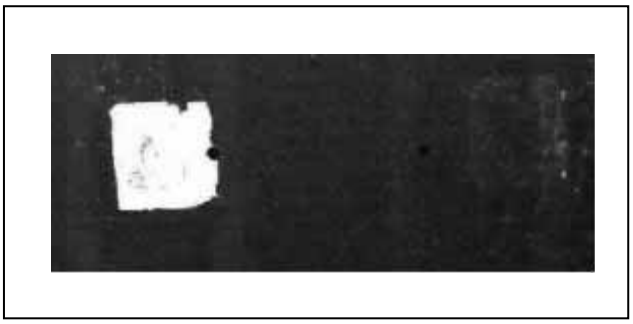


Abbildung 47 Beispielhafte Darstellung der Fluoreszenzauswertung des CRP-Assays nach Immobilisierung des Antikörpers anti-CRP C2 auf Polystyrol.

Gezeigt ist die adsorptive Immobilisierung des anti-CRP C2 Antikörpers bei pH 8,5 in 0,1 M Carbonatpuffer bei feuchter Lagerung. Links Messpunkt, rechts Kontrolle ohne anti-CRP C2 Antikörper.
Die einfachste und am schnellsten durchführbare Immobilisierungsstrategie ist eine Anlagerung der Biomoleküle an eine Festphase durch Selbstorganisation. Hierbei wird das

zu immobilisierende Molekül einfach auf die Oberfläche aufbegracht und inkubiert. Diese adsorbtive Beschichtung nutzt hydrophobe Wechselwirkungen der Biomoleküle mit der Polymeroberfläche aus und kann sehr stabile Verbindungen ermöglichen. Daher wurde diese Immobilisierungsstrategie vorrangig getestet. Tabelle 16 gibt eine Übersicht der Ergebnisse mit adsorptiven Beschichtungen.

Tabelle 16 Adsorptive Beschichtung auf Polystyrol

Immobilisierungsmethode	pH-Wert u. Puffer	Lagerung	Bewertung
AntiCRP C2 adsorbtiv	pH 7,3 PBS	feucht	++
AntiCRP C2 adsorbtiv	pH 7,3 PBS	trocken	+
AntiCRP C2 adsorbtiv	pH 8,5 Carbonat	feucht	+++
AntiCRP C2 adsorbtiv	pH 8,5 Carbonat	trocken	++
Protein A adsorbtiv	pH 7,3 PBS	feucht	++
Protein A adsorbtiv	pH 7,3 PBS	trocken	+

Anhand dieser generell sehr guten Ergebnisse bei der adsorbtiven Immobilisierung erkennt man, dass insbesondere die Trocknung der Chips den immobilisierten Antikörpern trotz des Einsatzes kompatibler Solute (z. B. Saccharose) irreversible Schäden zugefügt hat. Die adsorptive Immobilisierung von Protein A und anschließender Kopplung von antiCRP C2 Antikörper brachte keinen Vorteil gegenüber der direkten adsorptiven Immobilisierung des Antikörpers. Bei adsorptiven Techniken wurden generell nur sehr geringe Hintergrund bzw. unspezifische Bindungssignale auf der blockierten Polystyrol-Oberfläche detektiert.

Als Alternative zur adsorbtiven Beschichtung wurde die chemische bzw. kovalente Kopplung des Antikörpers mittels Aminosilanisierung der Oberfläche und anschließender NHS/DCC-oder GDA-Kopplung untersucht.
Da APTES in gängigen Immobilisierungstechniken nur in unpolaren organischen Lösungsmitteln eingesetzt werden kann, war eine Anpassung dieser Strategie an das empfindliche Polystyrol notwendig. Zur Auswertung kamen nur Chips mit einer Aminosilanisierung in Methanol oder Millipore®-Wasser, da die anderen Chips nach Inkubation mit anderen gängigen Lösungsmitteln nicht auswertbar waren.

Tabelle 17 Kovalente Beschichtung auf Polystyrol

Immobilisierungsmethode	Lösungsmittel APTES	Lagerung	Bewertung
APTS + NHS/DCC	Methanol	feucht	+
APTS + NHS/DCC	Methanol	trocken	-
APTS + NHS/DCC	Millipore®-Wasser	feucht	+
APTS + NHS/DCC	Millipore®-Wasser	trocken	-
APTS + GDA	Methanol	feucht	-
APTS + GDA	Methanol	trocken	-
APTS + GDA	Millipore®-Wasser	feucht	-
APTS + GDA	Millipore®-Wasser	trocken	-

Die Ergebnisse dieser kovalenten Immobilisierungstechnik waren durchweg sehr unbefriedigend. Daher wurde auf den Schritt der Aminosilanisierung mit APTES verzichtet und stattdessen plasma-amino-funktionalisierte Polystyrolchips der Firma Boehringer Ingelheim microParts zur weiteren Beschichtung eingesetzt. Hierdurch konnte der Einsatz zersetzender Lösungsmittel zur APTES-Inkubation vermieden werden. Die weitere Beschichtung erfolgte analog der oben beschriebenen kovalenten Kopplung. Zusätzlich wurden auch Antikörper per Selbstorganisation adsorptiv an die plasma-funktionalisierte Oberfläche gebunden. Dies geschah bei pH 8,5 in Carbonatpuffer.
Zur Optimierung dieses Systems wurden verschiedene Techniken der Plasma-funktionalisierung eingesetzt. Die Beschreibung „dünn“ steht hierbei für Schichtdicken von 20-100 nm, „sehr dünn“ für Schichten dünner als 20 nm. Alle Chips wurden nach erfolgter Beschichtung feucht gelagert.

Tabelle 18 Kovalente Beschichtung auf amino-plasma-funktionalisiertem Polystyrol

Immobilisierungsmethode	Schichtdicke Amino	Bewertung
NHS/DCC	dünn (20-100 nm)	+
NHS/DCC	sehr dünn (< 20 nm)	-
GDA	dünn (20-100 nm)	++
GDA	sehr dünn (< 20 nm)	+
Adsorption	dünn (20-100 nm)	-
Adsorption	sehr dünn (< 20 nm)	-

Durch den Einsatz plasma-funktionalisierter Polystyrolchips mit Amino-Oberfläche konnte die Immobiliserungsausbeute deutlich gesteigert werden. Man erkennt einen signifikanten

Unterschied zwischen dünner und sehr dünner Plasmafunktionalisierung; hierbei ist die Schichtdicke von 20-100 nm zu favorisieren. Als schonenste und effektivste Immobilisierungsmethode in dieser Tabelle ist die Quervernetzung mit Glutadialdehyd (GDA) zu identifizieren. Die Plasmafunktionalisierung verringert zudem die Immobilisierungsausbeute bei adsorptiver Beschichtung.
Insgesamt bleibt die Bindungsausbeute bei diesen kovalenten Kopplungstechniken aber immer noch hinter der adsorptiven Immobilisierungsmethode zurück.

Zur Analyse einer weiteren direkten Kopplungsmethode als Alternative zur Selbstorganisation kamen Photolinker zum Einsatz. Diese bifunktionellen Linker werden mithilfe von UV-Licht auf die Chip-Oberfläche gekoppelt. Die Immobilisierung des Biomoleküls erfolgt dann über Dipol-Interaktionen.

Tabelle 19 Direkte Beschichtung mit Photolinkern auf Polystyrol

Photolinker	Lagerung	Bewertung
FNPA	feucht	- (Eigenfluoreszenz)
FNPA	trocken	- (Eigenfluoreszenz)
Sulfo-HSAB	feucht	++
Sulfo-HSAB	trocken	+

Hierbei disqualifizierte sich das Fluoro-Nitro-Phenylazid durch seine unerwartet starke Eigenfluoreszenz für weitere Untersuchungen. Der Photolinker Sulfo-HSAB zeigte dagegen besonders bei feuchter Lagerung gute Ergebnisse, hat im Vergleich zu einer adsorptiven Immobilisierungsstrategie aber immer noch schlechtere Bindungsausbeuten. Zusätzlich kommen bei diesem Photolinker auch die höheren Materialkosten und die aufwendigere Beschichtungstechnik zur Betrachtung.

3.3 Versuche zur Detektion von Mycoplasma paratuberculosis LAM

Der Aufbau eines Analysensystems sollte über die Detektion von Lipoarabinomannan (LAM) erfolgen. Hierbei handelt es sich um ein Zellwandmolekül, das zu den Lipopolysacchariden gehört. Die Lipoarabinomannane sind spezifisch für die Gruppe der Mycobakterien; jede Mycobakterien-Art hat ein eigenes spezifisches Lipoarabinomannan. Hierbei variiert vor allem die Zusammensetzung der Mannan-Zucker-Kette.

Zur Detektion dieses Zellwandmoleküls wurde ein LAM-spezifischer Antikörper der Firma Lionex (Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um einen monoklonalen IgM-Antikörper. Eine erste Evaluation des Antikörpers zur Bestimmung seiner Einsatzfähigkeit in biosensorischen Anwendungen erfolgte mit der SPR. Analog zu der in Kap. 3.1 beschriebenen Detektion des C-reaktiven Proteins wurde ein Sandwich-Verfahren zur Detektion des LAM getestet. Hierzu wurde ein Teil der gelieferten Antikörper an einer Amino-Gruppe biotinyliert.

3.3.1 Messung im Sandwich-Prinzip mit Streptavidin

Das Messprinzip basierte auf einem SPR-Goldchip mit Biotinoberfläche. An die Biotingruppen wurde Streptavidin (150 µg/ml) gebunden; als Ankerprotein für den biotinylierten anti-LAM Antikörper (125 µg/ml). Die restlichen freien Bindungsstellen wurden mit BSA blockiert (150 µg/ml), anschließend das Antigen LAM (150 µg/ml) zugegeben. Im letzten Schritt ist dann der freie anti-LAM Antikörper (125 µg/ml) zur Detektion des gebundenen Antigens eingesetzt worden. Abb. 48 zeigt eine schmematische Darstellung dieses Messprinzips. Alle SPR-Messungen dieses Kapitels erfolgten in einem 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3.

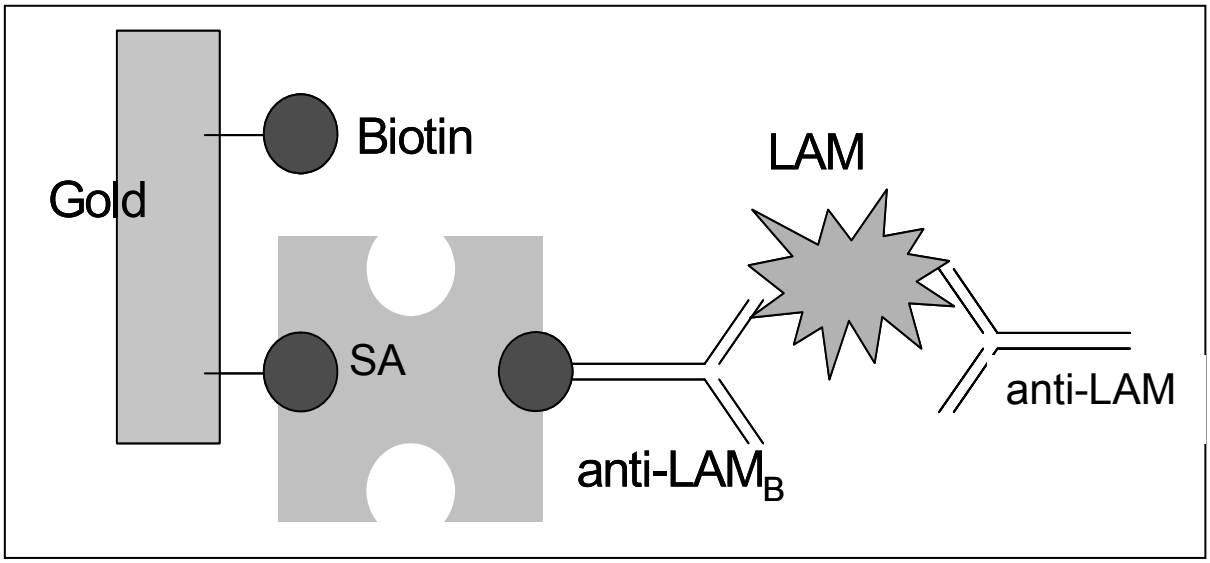


Abbildung 48 Schematische Darstellung des ersten LAM-Messprinzips. SA = Streptavidin, anti-LAMB = biotinylierter anti-LAM Antikörper.

Die Messung wurde doppelt ausgeführt. Beide Messungen zeigten nach Zugabe des anti-LAM Antikörpers zur Detektion des gebundenen LAM keine Anlagerung im Sandwich-Prinzip (siehe Abb. 49). Im Gegenteil, die Signalhöhe ist unmittelbar vor Zugabe des anti-LAM höher (450,5 AU) als nach Zugabe des anti-LAM Antikörpers mit nachfolgendem Spülen der Küvette (447,5 AU).

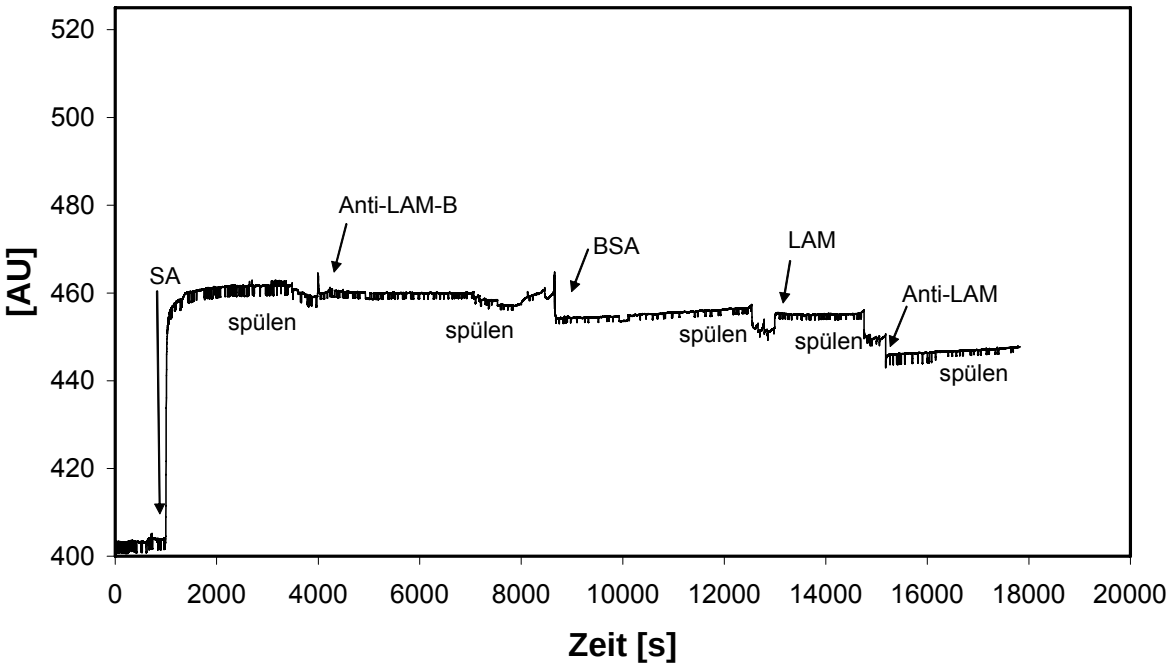


Abbildung 49 SPR-Sensogramm der Sandwich-Detektion von LAM mit Streptavidin als Ankermolekül. SA = Streptavidin.

Man erkennt gut die Bindung des Streptavidins an die Biotin-Oberfläche des Goldchips. Auch die Zugabe des biotinylierten anti-LAM Antikörpers führt zu einer geringen Erhöhung des Signals, das heißt eine Immobilisierung des Antikörpers an das Ankerprotein über die eingefügte Biotinfunktion hat stattgefunden. Die Zugabe von BSA soll freie Bindungsstellen absättigen, da kein Anstieg des Signals detektiert werden kann ist die Chipoberfläche anscheinend ausreichend mit Streptavidin belegt.
Anscheinend wird kein LAM an die Streptavidin- und anti-LAM_B-Konstruktion gebunden, wodurch auch eine Kopplung des anti-LAM Detektionsantikörpers nicht möglich ist. Alternativ kann auch der freie anti-LAM Antikörper zur Detektion nicht an das gebundene und präsentierte LAM ankoppeln.

3.3.2 Messung im Sandwich-Prinzip mit C18-Oberfläche

Da mit der Biotinylierung des anti-LAM_B-Antikörpers eine Modifikation des Proteins vorgenommen wurde, ist ein Einfluß auf das Bindungsverhalten des Antikörpers möglich. Es wurde daher ein weiteres Testsystem ohne Streptavidin als Ankerprotein zur Detektion des LAM analysiert. Hierbei wurde die bereits beschriebene hydrophobe C18-Alkyl-Oberfläche verwendet. Durch hydrophobe Wechselwirkungen mit einem zu immobilisierendem Biomolekül kann so eine unspezifische Immobilisierung des Moleküls an die Alkyl-Oberfläche erreicht werden. Das Verfahren beruht auf Selbstorganisation und randomisierter Ausrichtung der Biomoleküle. Eine Modifikation des Moleküls ist hierfür nicht notwendig.

Im Rahmen der Messung wurde zuerst der anti-LAM Antikörper (125 µg/ml) auf der Alkyl-Oberfläche immobilisiert. Dieser soll das Antigen LAM aus einer simulierten Pufferprobe exrahieren und dem gleichen Antikörper zur Detektion präsentieren. Nach Immobilisierung des ersten Antikörpers wurden alle weiteren freien Bindungsstellen mit BSA (150 µg/ml) blockiert. Nach Zugabe des Antigens LAM (125 µg/ml) in PBS-Puffer erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörpers anti-LAM mit einer Konzentration von 125 µg/ml. Nach jeder Biomolekülzugabe wurde die Messküvette 3-mal mit Puffer ausgiebig gespült. Eine schematische Abbildung des Messprinzips ist in Abb. 50 abgebildet, das SPR-Sensogramm dieses Messprinzips zeigt Abb. 51.

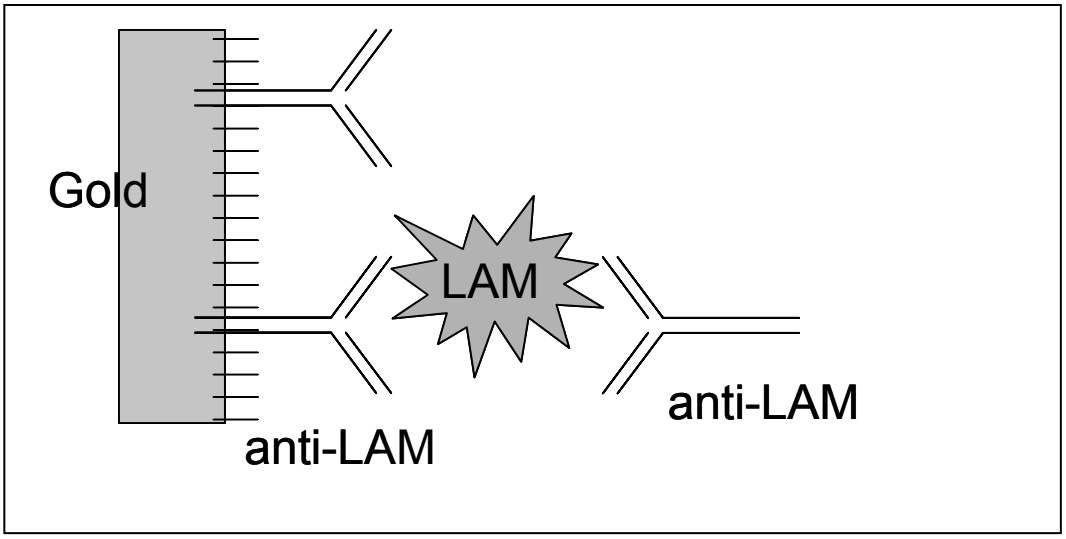


Abbildung 50 Schematische Darstellung des Messprinzips im Sandwich-Verfahren auf alkylierter Chip-Oberfläche.

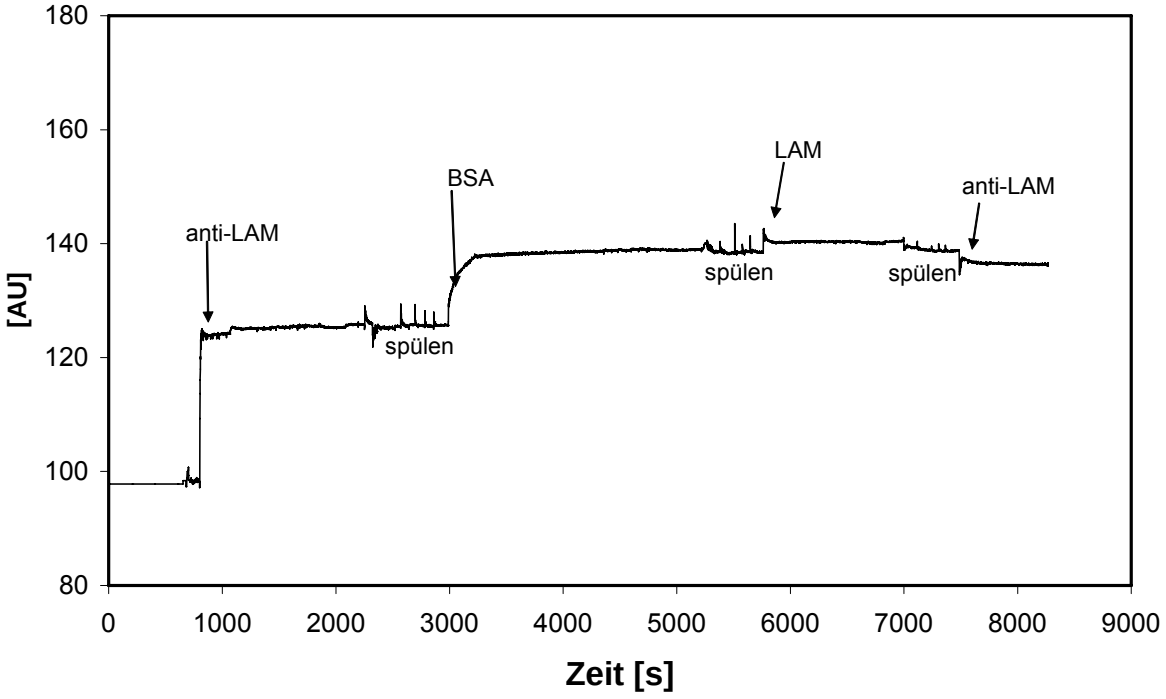


Abbildung 51 SPR-Sensogramm der Sandwich-Detektion von LAM auf alkylierter C18-Oberfläche.

Man erkennt eine sehr deutliche Immobilisierung des anti-LAM Antikörpers auf der alkylierten C18-Oberfläche des Goldchips. Auch die Zugabe von BSA führt zu einer Steigerung des Messsignals bzw. zu einer Anlagerung von Molekülen. Hier werden verbliebende freie Bindungsstellen abgesättigt. Die Zugabe des LAM führt zu einer geringen Erhöhung des Signals, wobei es sich aber um Messartefakte handelt, da nach dem Spülen das Messsignal die gleiche Höhe wie vor der Zugabe des LAM hat. Bei Zugabe des zweiten anti-LAM als Detektionsantikörper ist keine Erhöhung des Messsignals detektierbar, es findet keine Kopplung des Antikörpers an das eventuell präsentierte LAM statt. Die Biotinylierung hatte also keinen feststellbaren Einfluss auf die Bingungsfähigkeit des anti-LAM Antikörpers. Möglich ist weiterhin, dass das LAM nicht gebunden und präsentiert wird oder das der zweite anti-LAM Detektionsantikörper nicht an das präsentierte LAM binden kann.

3.3.3 Detektion von *M. paratuberculosis* LAM mit zusätzlichen Antikörpern

Nach dem nicht erfolgreichen Einsatz des anti-LAM Antikörpers zur Bindung an präsentiertes LAM im Sandwich-Prinzip wurde der Einsatz eines weiteren Antikörpers getestet. Da für das *M. paratuberculosis* LAM keine kommerziell erhältlichen Antikörper zur Verfügung standen, musste auf einen Antikörper gegen *Mycobacterium tuberculosis* (anti-MT) mit einer Kreuzspezifität gegen *M. paratuberculosis* ausgewichen werden. Hierbei handelte es sich um einen monoklonalen IgG Antikörper.

Zur Testung dieses Systems wurde wieder im Sandwich-Prinzip gemessen. Hierzu wurde anti-MT Antikörper (150 µg/ml) auf der alkylierten C18-Oberfläche des Goldchips immobilisiert. Nach Blockierung der freien Bindungsstellen mit BSA (150 µg/ml) erfolgte die Zugabe des LAM (300 µg/ml), welches an den immobilisierten anti-MT Antikörper binden sollte. Das so immobilisierte und präsentierte LAM sollte nun durch den zugegebenen anti-LAM Detektionsantikörper (125 µg/ml) markiert werden. Abbildung 52 stellt das Messprinzip schematisch dar.

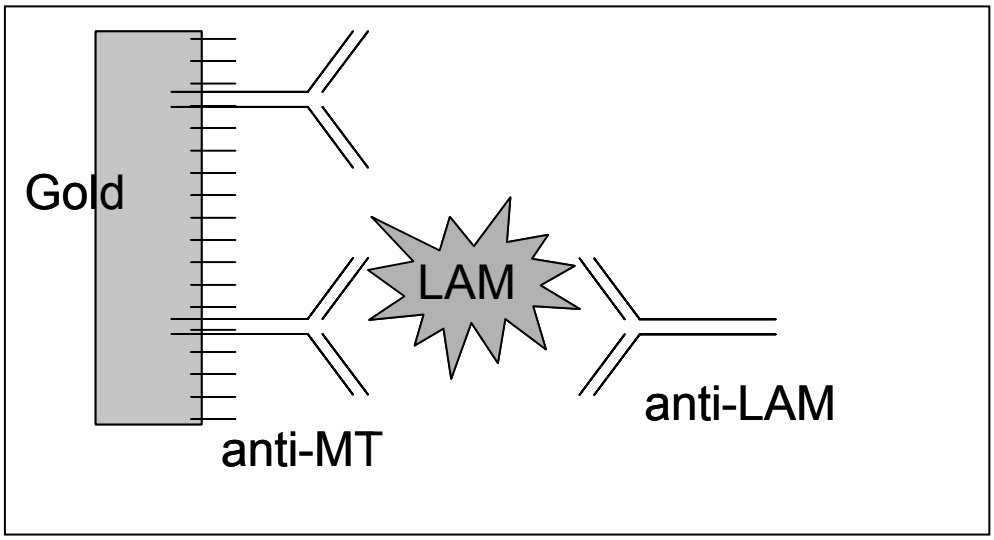


Abbildung 52 Schematische Darstellung des Messprinzips im Sandwich-Verfahren mit zwei verschiedenen Antikörpern auf alkylierter Chip-Oberfläche. (Anti-MT = Antikörper gegen *M. tuberculosis* LAM, LAM = Lipoarabinomannan, anti-LAM = Antikörper gegen *M. paratuberculosis)*

Da der anti-LAM als IgM-Antikörper bei einer randomisierten Immobilisierung an der C18-Oberfläche sich eventuell falsch ausrichten könnte und dadurch keine möglichen Bindungsstellen präsentieren würde, ist als Immobilisierungsplatform für das LAM der anti-MT Antikörper gewählt worden. Dieser könnte sich durch seine Eigenschaft als IgG-Antikörper und kleinere Molekülgröße eventuell besser auf der Immobilisierungsoberfläche ausrichten.

Das aus diesem Test aufgenommene SPR-Sensogramm ist in Abbildung 53 gezeigt. Der Versuch wurde doppelt ausgeführt; zusätzlich wurde ein Kontrollversuch ohne LAM getestet.

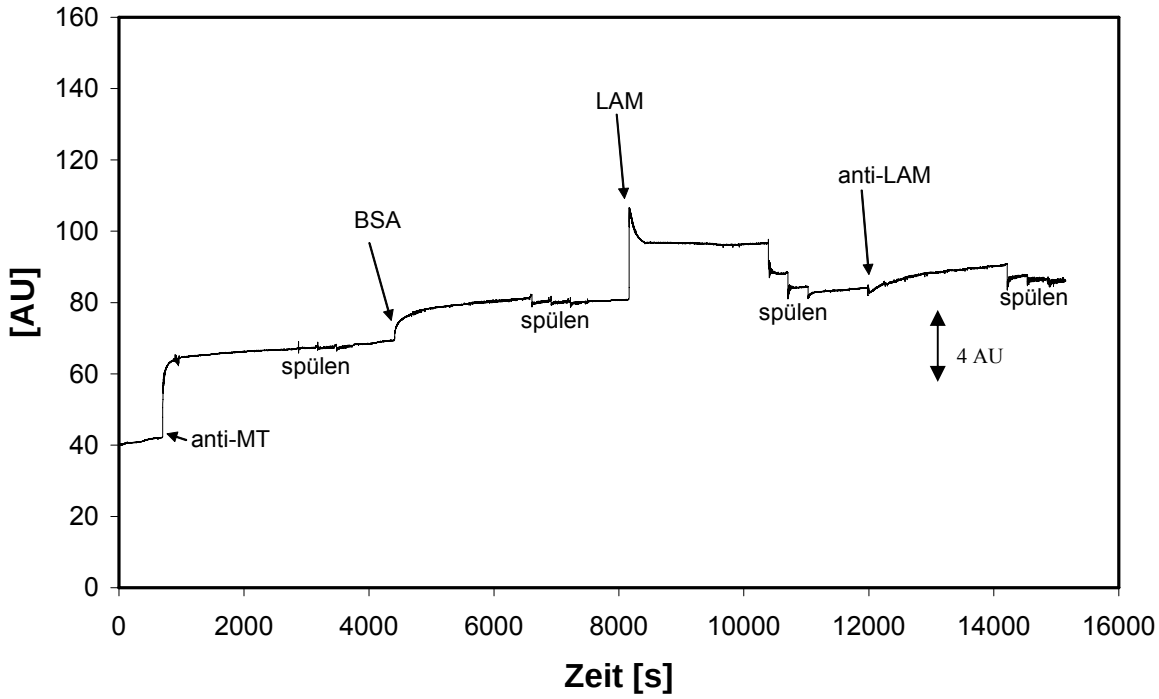


Abbildung 53 SPR-Sensogramm des Sandwich-Messprinzips mit den Antikörpern anti-MT und anti-LAM

Die Immobilisierung des anti-MT Antikörpers lässt sich gut feststellen. Die Zugabe von BSA hat einige verbliebende freie Bindungsstellen abgesättigt und führte durch die Anlagerung des BSA an die Chipoberfläche zu einer Erhöhung des Signals. Die Zugabe des LAM führt zu einer sehr starken Signalerhöhung, die aber ein Messartefakt darstellt. Das Signal sinkt nach Spülen der Küvette auf einen Signalwert knapp über dem Ausgangswert vor Zugabe des LAM (vorher 81,5 AU, nach Spülung 83,5 AU). Die Zugabe des anti-LAM Antikörpers führt zu einer Erhöhung des Messsignals nach dem spülen um 4 AU (3,5 AU beim Parallelversuch). Dieser Signalzuwachs ist sehr gering. Im Kontrollversuch ohne das Antigen LAM wurde kein dauerhafter Signalzuwachs nach dem Spülen der Messküvette gemessen; das Signal sank erwartungsgemäß wieder auf seinen Ausgangswert vor Zugabe des LAM.

Es konnte also eine geringfügige Anlagerung des anti-LAM Antikörpers an das gebundene und präsentierte LAM detektiert werden. Somit ist zumindest eine Funktionalität des Anti-LAM Antikörpers und des Messprinzips belegbar. Für biosensorische Anwendungen reicht die Signalsteigerung von ca. 4 AU bei einer relativ hohen Antigenkonzentration von 300 µg/ml zur Etablierung eines Biosensors nicht aus; eine Anwendung des anti-LAM

Antikörpers in ELISA-Anwendungen zur Detektion des *M. paratuberculosis* LAM erscheint hier deutlich sinnvoller.

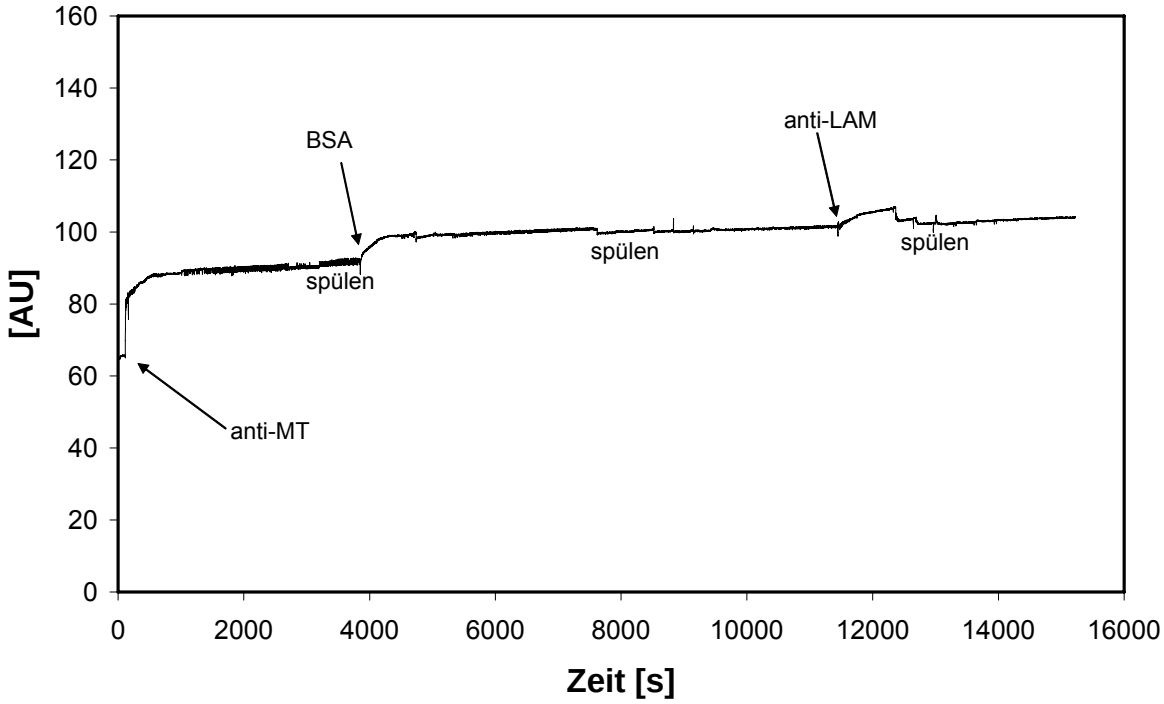


Abbildung 54 SPR-Sensogramm der Kontrolle des des Sandwich-Messprinzips mit den Antikörpern anti-MT un d anti-LAM ohne LAM (Kontrollversuch)

Im Gegensatz zur Messung in Abb. 53 wurde hier nach BSA-Zugabe nur gespült und anschließend anti-LAM zugegeben. Das entsprechende Antigen LAM fehlt.

3.4 Magnetische Detektion des C-reaktiven Proteins mit ABICAP®-Säulen

3.4.1 Vorversuche zur Optimierung der magnetischen Detektion

Der Einsatz der magnetischen Detektion mit ABICAP®-Säulen machte eine Optimierung des Detektionssystems mit Magnetic Beads notwendig. Hierzu bestanden vor Beginn dieser Arbeit noch keine Erfahrungswerte. Der erste Abschnitt dieses Kapitels beschäftigt sich daher mit der Entwicklung und Optimierung der magnetischen Detektion mit Magnetic Beads unter Zuhilfenahme des bereits aus Kap. 3.1 bekannten Detektionssystems für das C-reaktive Protein. In diesem Detektionsystem wurden zwei verschiedene anti-CRP Antikörper, die Klone C2 und C6, eingesetzt. Abweichend zu Kap. 3.1 wurde der anti-CRP C2 nun als Extraktionsantikörper an die Polyethylensinterkörper der ABICAP®-Säulen immobilisiert. Der biotinylierte anti-CRP $C6_B$ Antikörper (vgl. Kap. 3.1) wurde jetzt nicht mehr mithilfe des Ankerproteins Streptavidin an einer Festphase immobilisiert, sondern diente der Markierung des extrahierten und präsentierten Analyten CRP mit Magnetic Beads. Zu diesem Zweck erfolgte die Kopplung des biotinylierten anti-CRP $C6_B$ Antikörpers an die Magnetic Beads über das Ankerprotein Streptavidin, welches auf der bereits vom Hersteller modifizierten Polyvinyl-Oberfläche der Magnetic Beads gebunden war.

Die zuerst zur Verfügung stehenden Magnetic Beads Typ SAV1 und SAV2 von chemagen wurden mit diesem Detektionsystem getestet. Typ SAV1 hat eine durchschnittliche Partikelgröße von 0,7 µm, Typ SAV2 von 2 µm. Bei den ersten Vorversuchen ohne Analyten fiel bereits auf, dass die Magnetic Beads Typ SAV2 die PE-Sinterkörper nicht quantitativ passierten. Die Beads hafteten auf dem Sinterkörper, obwohl dieser einen durchschnittlichen Porendurchmesser von 50 µm hatte (Typ 180.C, Herstellerangaben). Die Magnetic Beads Typ SAV1 passierten zwar den PE-Sinterkörper, bei Messungen mit Analyt zeigten sich aber sehr hohe Blindwerte (Signal ohne Analyt) von ca. 65 % des Messwertes.

Da diese Magnetic Bead-Typen also eine anscheinend zu hohe Affinität zu den PE-Sinterkörpern hatten, wurde ein anderer Magnetic Bead-Typ mit modifizierter Oberflächenbeschichtung getestet. Die bereits untersuchten Magnetic Beads Typ SAV1 und SAV2 hatten eine Oberflächenbeschichtung mit Streptavidin, welches über eine Carboxy-Gruppe an die Oberfläche gekoppelt war. Die neu getesteten Beads hatten eine

Streptavidin-Oberfläche, die über eine Isothiocyanat (NCO)-Kopplung immobilisiert worden war. Auch hier zeigte sich ein vermeintliches Größenproblem bei den Magnetic Beads Typ SAV2 (NCO); die Partikel Typ SAV1 (NCO) hatten zwar immer noch einen hohen Blindwert von ca. 39 % des Messwertes, erschienen aber einsetzbar. Mit diesem Partikeltyp wurde hauptsächlich weitergearbeitet.

Abbildung 55 zeigt eine REM-Aufnahme von Magnetic Beads mit Bakterien.

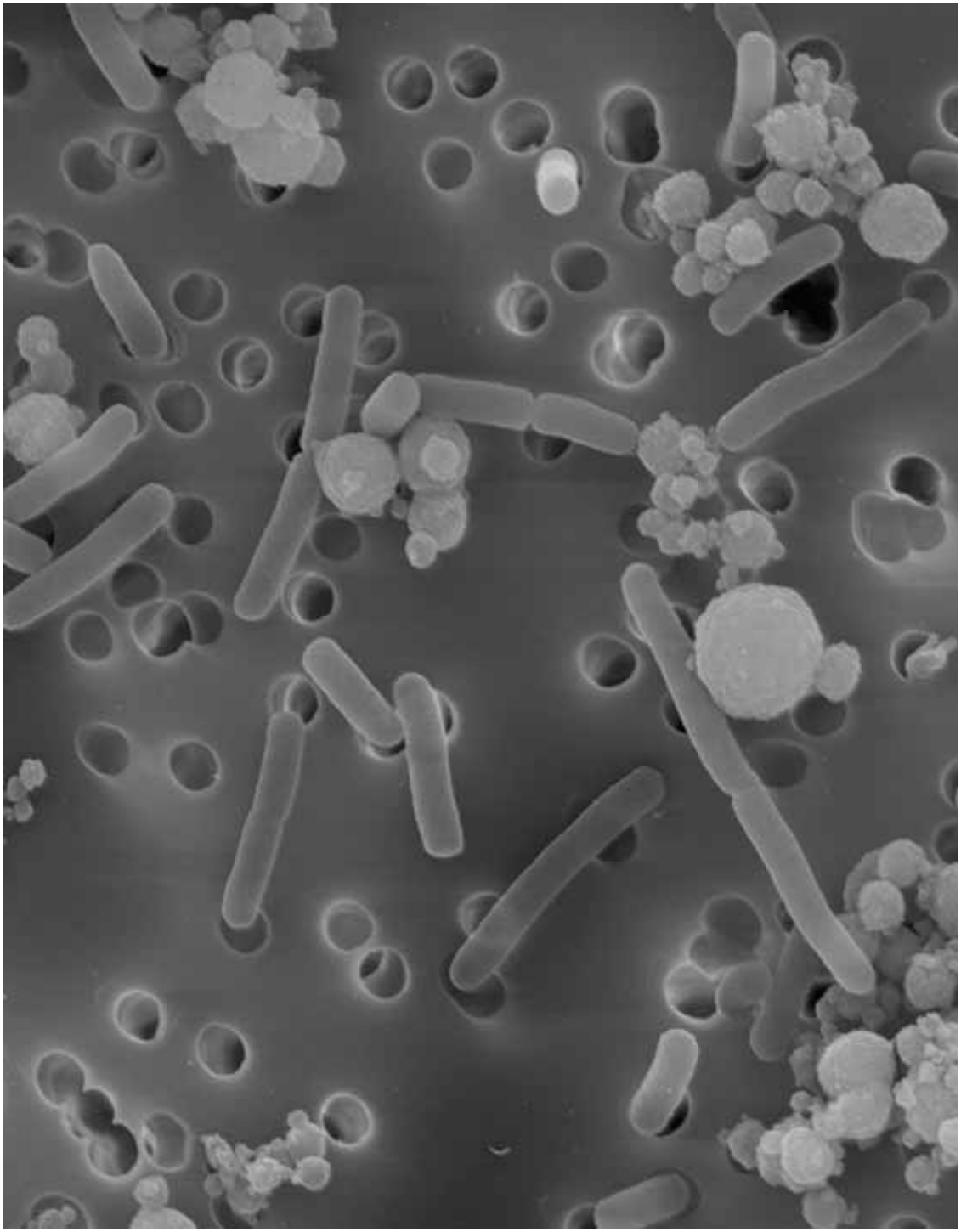


Abbildung 55 REM-Aufnahme von Magnetic Beads mit gebundenen Bakterien (10000x)
© Dennis Kunkel Microscopy (2007), zusammen mit M. Meyer

Es handelt sich um Magnetic Beads Typ SAV1 (NCO) mit einer Streptavidin-Oberfläche. Daran gekoppelt ist ein nicht erkennbarer, biotinylierter Antikörper gegen die vorhanden *E. coli*-Zellen.

Zur Ermittlung der optimalen Magnetic Beads erfolgten Einzelmessungen des CRP-Detektionssystems mit einer definierten Analytenkonzentration. Alle eingesetzen Magnetpartikel hatten eine Streptavidinoberfläche, so dass der biotinylierte anti-CRP $C6_B$ Antikörper zur Markierung des Analyten mit Magnetic Beads eingesetzt werden konnte.

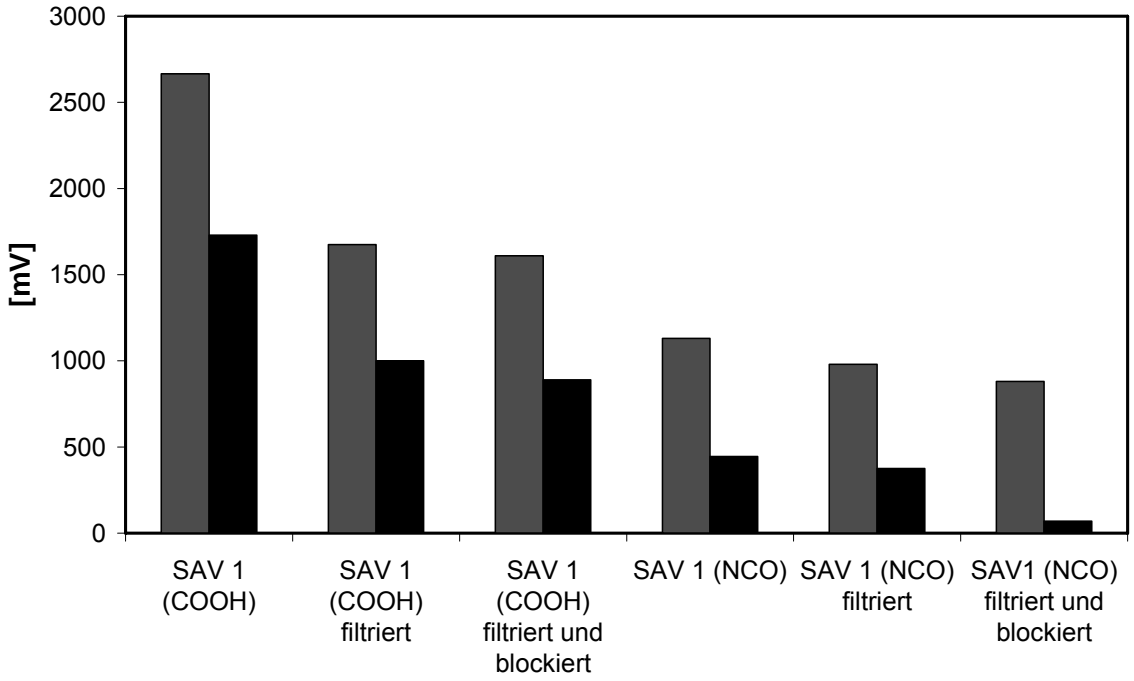


Abbildung 56 Ergebnisse des CRP-Assays bei einer definierten Analytkonzentration mit filtrierten Beads und unter Zugabe von Casein. Die erste Säule zeigt den Messwert, die zweite Säule (schwarz) den zugehörigen Blindwert ohne Analyt (n=2).

Um die Gründe für die hohen Blindwerte zu analysieren, wurde eine exakte Größenbestimmung der Partikel in einem ParticleSizer durchgeführt. Zusätzlich wurden Magnetic Beads nach einer Filtration durch einen unbehandelten, leeren PE-Sinterkörper einer Größenbestimmung unterzogen.

Tabelle 20 Größenbestimmung der Magnetic Beads

Partikeltyp	Durchmesser [µm]	Durchmesser filtriert [µm]
SAV1 (COOH)	6 µm	1,2 µm
SAV1 (NCO)	3 µm	0,7 µm

Möglichst kleine Beads konnten also erst nach einer Filtration der Magnetic Beads durch einen unbehandelten PE-Sinterkörper gewonnen werden. Da laut Hersteller die Magnetpartikel mit einem definierten Durchmesser von 0,7-1 µm hergestellt werden, erscheint es möglich, dass die Partikel sich bei der Lagerung sekundär zu größeren Aggregaten verbinden. Diese größeren Partikel können durch eine Filtration dann leicht abgetrennt werden. Zur Analye der Blindwerte wurden verschiedene Messungen dieser Fraktionen mit dem CRP-Detektionssystem durchgeführt.
Als weitere Entwicklungsstufe wurde der Einsatz von Casein im Magnetic Bead-Messpuffer getestet. Dieses wurde als Caseinpuffer der Firma SDT in einer Konzentration von 10 % (v/v) dem Messpuffer zugesetzt. Die Endkonzentration betrug dann 5,5 µg/ml Casein. Ziel war die Blockierung der restlichen freien Bindungsstellen auf der Oberfläche der Magnetic Beads; zusätzlich sollte das Casein eine unspezifische Wechselwirkung der Magnetic Beads mit dem PE-Sinterkörper verringern.

Interessant bei dieser Messung ist das Verhältnis zwischen Messwert und Blindwert. Je besser das Verhältnis, desto sensitiver und verlässlicher kann eine Detektion durchgeführt werden. Man erkennt das die Magnetic Beads Typ SAV1 (NCO) ein deutlich besseres Mess-/Blindwert-Verhältnis haben als die Beads Typ SAV1 (COOH). Durch Filtration der Magnetic Beads erreicht man bei beiden Typen eine gerinfügige Verbesserung des Verhältnisses, gleichzeitig sinkt aber auch der Absolutwert. Durch die Filtration wird die Gesamtmenge an Magnetic Beads verringert. Sehr effizient ist die Zugabe von Casein bei Magnetic Beads Typ SAV1 (NCO); das Verhältnis zwischen Mess- und Blindwert wird hierdurch signifikant verbessert. Insgesamt konnte durch den Einsatz von Magnetic Beads Typ SAV1 (NCO) nach Filtration und Zugabe von Casein eine Reduzierung des Blindwertanteils am Messwert von 65 % bei Typ SAV1 (COOH) auf 8 % bei Typ SAV1 (NCO) erreicht werden.
In weiteren Messungen wurden daher Magnetic Beads des Typs SAV1 (NCO) filtriert und mit Casein-haltigem Messpuffer eingesetzt.

Weierhin wurden zwei zusätzliche Typen von Magnetpartikel mit einem Durchmesser deutlich kleiner als 0,7 µm eingesetzt. Die Partikel hatten ebenfalls eine Beschichtung mit Streptavidin und wurden mit dem CRP-Detektionsverfahren getestet. Die gemessenen Durchmesser waren 100 nm und 10 nm. Das gemessene Signal war bei beiden Typen von

Magnetic Beads zu gering. Die sehr kleinen Partikel enthielten anscheinend nicht ausreichend Magnetit für eine Detektion mit dem Magnet-Reader.

Außerdem erfolgte eine Analyse zur Charakterisierung der Kopplung des Markierungsantikörpers anti-CRP C6. In den bisherigen Tests wurde dieser in biotinylierter Form eingesetzt, da über das Biotin-Motiv eine Kopplung an die Streptavidin-Oberfläche der Magnetic Beads möglich ist. Als Alternative wurden Magnetic Beads mit einer selbst-immobilisierenden Oberfläche mit Isothiocyanat eingesetzt und der Antikörper anti-CRP C6 daran immobilisiert. Da die Bildung größerer Aggregate auch bei diesem Magnetic Bead-Typ möglich ist wurde versucht, diese Partikel ebenfalls durch einen unbehandelten PE-Sinterkörper zu filtrieren. Hierbei erfolgte aber eine Immobilisierung der Magnetic Beads an die Polyethylenoberfläche. Daher wurden diese Magnetic Beads Typ SAV1 AK unfiltriert eingesetzt.

Zusammenfassend kann man feststellen, das der Einsatz von Magnetpartikeln des Typs SAV1 (NCO), verdünnt auf 1:100 (v/v), in Kombination mit einer Filtration der Magnetic Bead-Lösung und Zugabe von Casein zum Messpuffer für die magnetische Detektion ideal ist. Die Immobilisierung der Markierungsantikörper erfolgte über eine Biotin-Streptavidin-Kopplung.

3.4.2 Etablierung eines Systems zur Detektion des C-reaktiven Proteins

Für die Etablierung eines Detektionssystems für das C-reaktive Protein mithilfe von Magnetic Beads und ABICAP®-Säulen wurde das gleiche Detektionsverfahren wie in Kap. 3.4.1 angewendet. Dieses System wurde zu diesem Zweck komplett optimiert.
Das Detektionsverfahren beruht auf zwei Antikörpern gegen das C-reaktive Protein, einem Extraktionsantikörper anti-CRP C2 und einem Detektions- bzw. Markierungsantikörper anti-CRP C6. Der Extraktionsantikörper anti-CRP C2 wird an den PE-Sinterkörper der ABICAP®-Säule immobilisiert. Seine Aufgabe bei sequentiellen Messungen ist die Extraktion des Analyten CRP aus der Probe. Das extrahierte CRP wird gebunden und auf dem PE-Sinterkörper präsentiert. Der Detektionsantikörper wird in biotinylierter Form als anti-CRP $C6_B$ eingesetzt. Die Biotinylierung erfolgte an endständigen Amino-Gruppen. Über diese Biotin-Funktion wird der Antikörper an die Streptavidin-Oberfläche der verwendeten Magnetic Beads gekoppelt. Bei Zugabe dieses Antikörper-Magnetic Bead-

Konjugats auf die ABICAP®-Säule bindet der Detektionsantikörper an das präsentierte CRP. Somit wird jenach der Menge an vorhandenem CRP eine korrelierende Menge an Magnetic Beads auf dem PE-Sinterkörper gebunden. Nach dem Ausspülen ungebundener Bindungspartner und Magnetic Beads kann die ABICAP®-Säule dann im Magnet Reader ausgemessen werden.

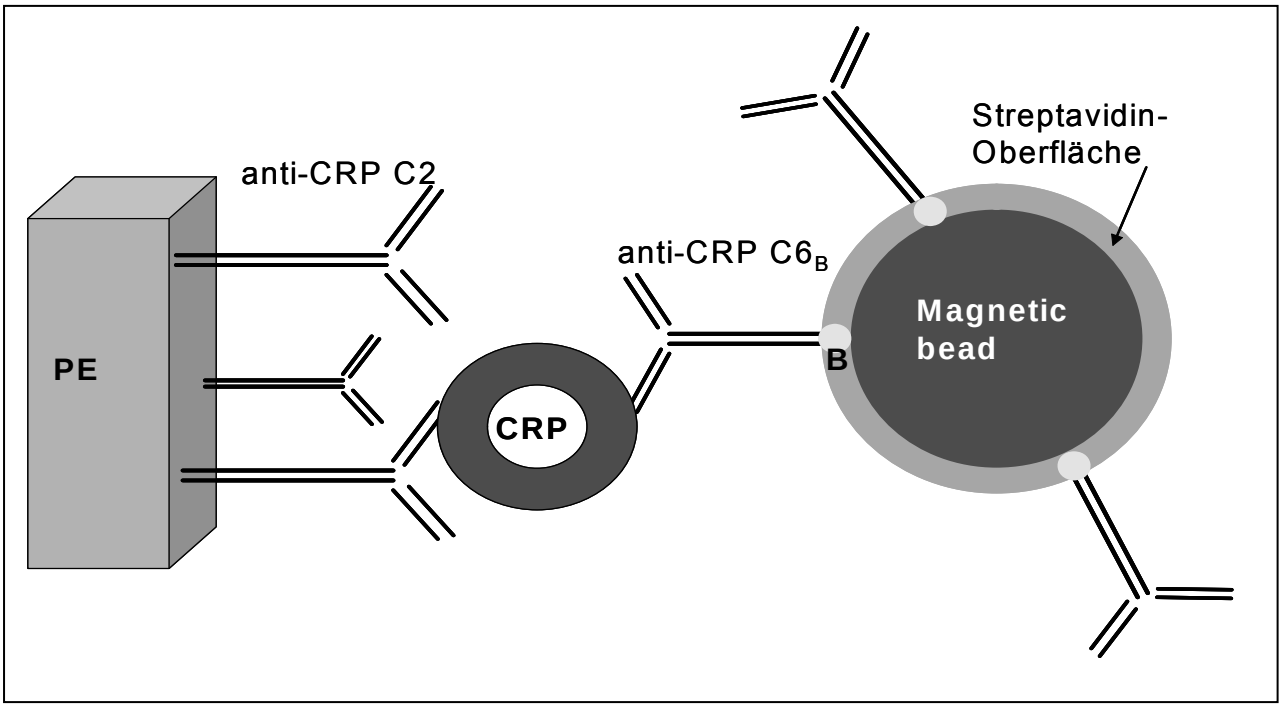


Abbildung 57 Schematische Darstellung des Detektionsprinzip für das C-reaktiven Protein. (PE = Polyethylensinterkörper, CRP = C-reaktives Protein, B = Biotin-Funktion).

Als erster Optimierungsansatz wurden verschiedene Immobilisierungstechniken für den Extraktionsantikörper anti-CRP C2 am PE-Sinterkörper der ABICAP®-Säule getestet. Hierfür wurden jeweils 10 µg des Antikörpers pro PE-Sinterkörper eingesetzt. Die verwendeten Immobiliserungsmethoden waren die auch für ELISA-Techniken eingesetzte adsorptive Beschichtung durch Selbstorganisation und eine kovalente Kopplung mit NHS/DCC mit verschiedenen Herstellungsvarianten.

Zur Charakterisierung der Immobilisierungsausbeute wurde der CRP-Assay wie oben beschrieben ausgeführt. Es wurden definierte CRP-Konzentration von 0,33-1,0 µg/ml CRP bei einem Probenvolumen von 500 µl verwendet. Die Magnetic Bead-Lösung im Vorfeld verdünnt (1:100 v/v), filtriert und mit Caseinpuffer versetzt worden. Der Detektionsantikörper wurde in einer Konzentration von 20µg pro ml Magnetic Bead-

Lösung eingesetzt. Die pro Säule zugegebene Menge an Magnetic Bead-Lösung betrug 500 µl, das heißt, pro ABICAP®-Säule wurden 10 µg anti-CRP $C6_B$ eingesetzt. Die Magnetic Beads-Lösung und die CRP-Probe wurden in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 verdünnt.

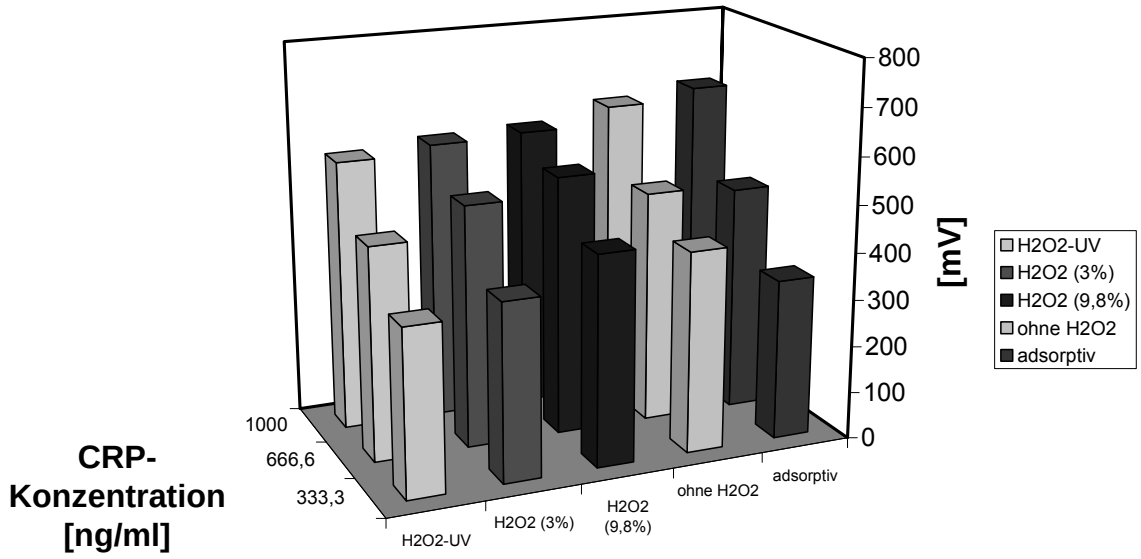


Abbildung 58 Vergleich der Immobilisierungsstrategien für den Extraktionsantikörper anti-CRP C2 am Polyethylen-Sinterkörper (n=3).

Die Spalte H_2O_2-UV beinhaltet die in Kap. 2.10.6 beschriebene NHS/DCC-Kopplung. Hierbei wird über H_2O_2 und UV-Licht eine Hydroxylierung der Oberfläche erzielt. Die Spalten H_2O_2 (3%) und H_2O_2 (9,8%) wurden anstelle von UV-Licht mit H_2O_2-Dampf behandelt. Die weitere NHS/DCC-Kopplung erfolgte analog zur ersten Spalte. Die Spalte „ohne H_2O_2" enthält eine Kontrolle ohne Behandlung mit H_2O_2. Die Spalte „adsorptiv" enthält die klassische adsorptive Beschichtung. Die Immobilisierungstechnik mit der höchsten Ausbeute bzw. mit dem höchsten Messsignal war die adsorptive Beschichtung ohne gerichtete Immobilisierung. Die kovalente NHS/DCC-Kopplung zeigte ähnliche Ergebnisse, wobei die Kontrolle ohne H_2O_2 ebenfalls sehr gut war und somit die NHS/DCC-Kopplung in Frage stellt. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die adsorptive Beschichtung für diesen Assay weiterhin verwendet; sie weist außerdem die höchste Steigung innerhalb der drei getesteten Konzentrationen auf.

Zur Optimierung der adsorptiven Beschichtungsmethode wurden verschiedene Immobilisierungspuffer und pH-Werte getestet. Hierzu wurde der zu immobilisierende Extraktionsantikörper jeweils mit der gleichen Konzentration von 10 µg pro PE-Sinterkörper in dem jeweiligen Puffer verdünnt und analog zur beschriebenen Immobilisierungstechnik aus Kap. 2.10.6 eingesetzt. Die beschichteten ABICAP®-Säulen wurden dann mit dem CRP-Assay getestet. Die Konzentration des Analyten CRP betrug hierbei 2,5 µg pro ml (Probenvolumen 500 µl) und es wurden 10 µg Extraktionsantikörper anti-CRP $C6_B$ pro PE-Sinterkörper-Equivalent der Magnetic Bead-Lösung eingesetzt. Die Messungen erfolgten in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3.

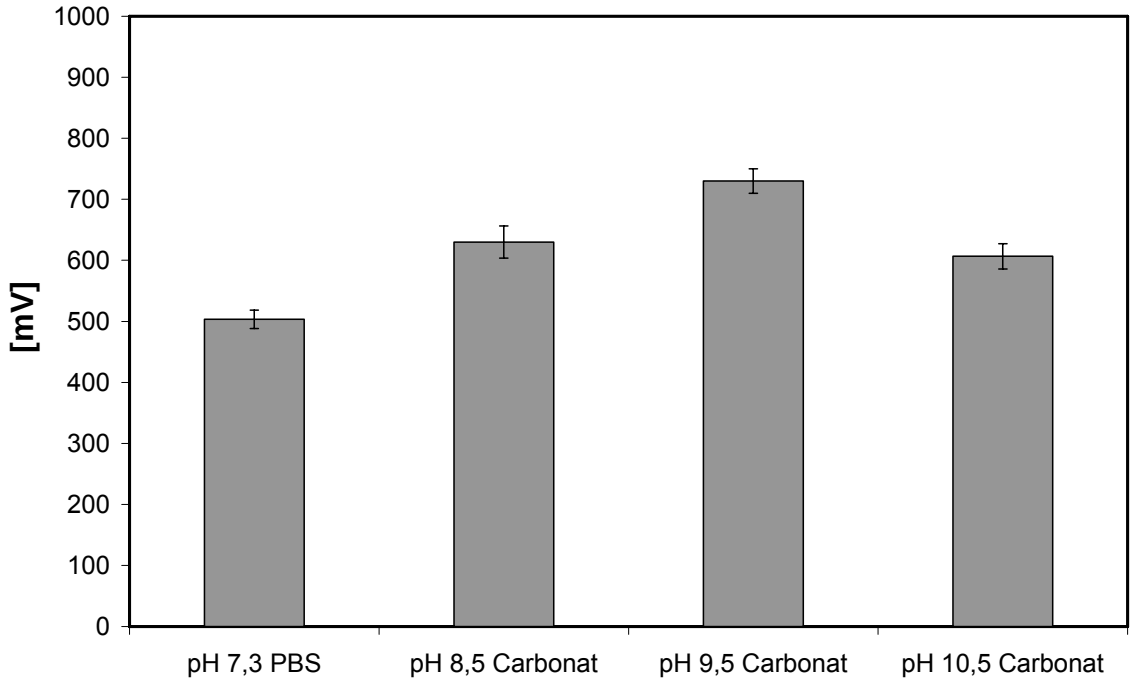


Abbildung 59 Variation des Immobilisierungspuffers und pH-Wertes bei adsorptiver Immobilisierung des Extraktionsantikörpers anti-CRP C2. Alle Puffer waren 0,1 M, PBS = PBS-Puffer, Carbonat = Carbonat –Puffer, (n=3).

Hierbei zeigte sich, dass eine adsorptive Immobilisierung des Extraktionsantikörpers am besten in 0,1 M Carbonat-Puffer pH 9,5 erfolgen sollte. Dieser Puffer bei pH 9,5 wird auch in gängigen ELISA-Coatings eingesetzt.

Zur Testung der Lagerstabilität der adsorptiven Beschichtung wurde nach verschiedenen Lagerdauern beschichtete Säulen mit dem CRP-Assay getestet. Die Konzentration der Antikörper war jeweils 10 µg pro Säule. Die getestete Analyt-Konzentration war 0,5 µg/ml CRP. Die Säulen wurden bei 4°C in einem Caseinpuffer (1:10 v/v verdünnt in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3) gelagert. Die Magnetpartikel wurden nicht filtriert oder vorbehandelt. Außerdem wurde der Analyt mit dem biotinylierten Antikörper und den Magnetic Beads für 2 h vorinkubiert und dann der gesamte Ansatz über die Messsäule gegeben. Die bei 4° C gelagerten Säulen wurden auf Raumtemperatur gebracht und vor der Verwendung mit 500 µl Messpuffer (0,15 M PBS-Puffer pH 7,3) gespült.

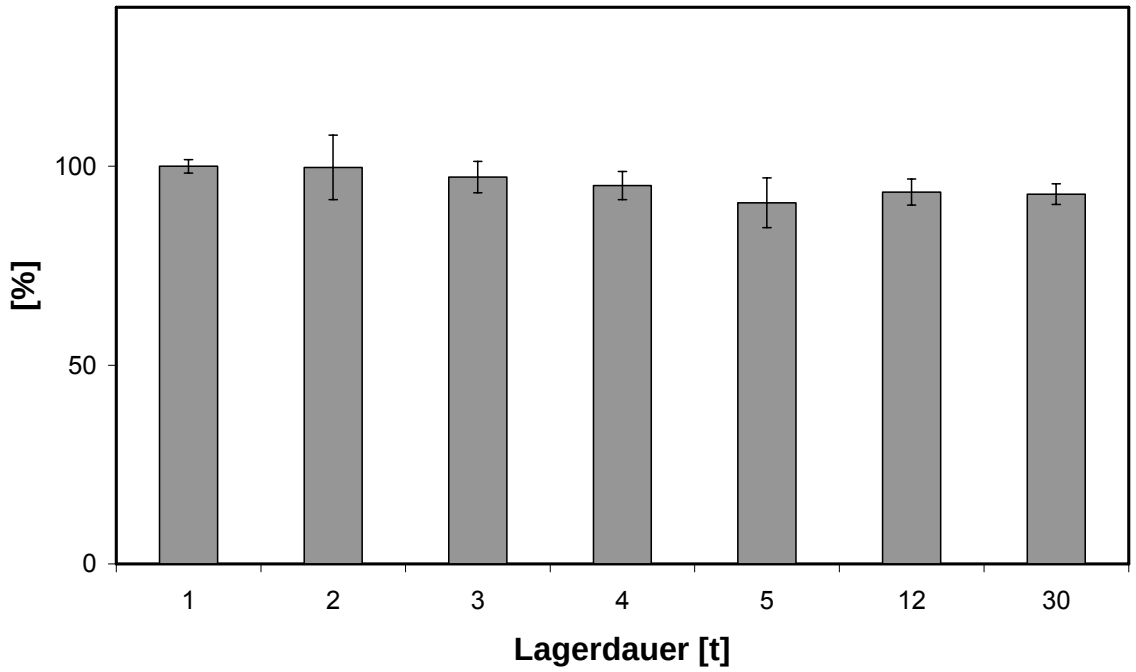


Abbildung 60 **Lagerstabilität der adsorptiven Beschichtung.** (Tag 1 = 100 %, anti-C6b = 5 µg/PE-S., anti-C2 = 10 µg/PE-S., CRP = 1 µg/ml, n=3).

Einen sehr großen Einfluss auf die Sensitivität eines immunodiagnostischen Bioassays hat oftmals die Konzentration der eingesetzen Antikörper. Daher wurde die eingesetze Konzentration der Antikörper anti-CRP C2 und anti-CRP $C6_B$ variiert. Die Konzentration des Partner-Antikörpers wurde während der Variation bei konstant 10 µg pro PE-Sinterkörper gehalten. Gemessen wurde wiederum in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3.

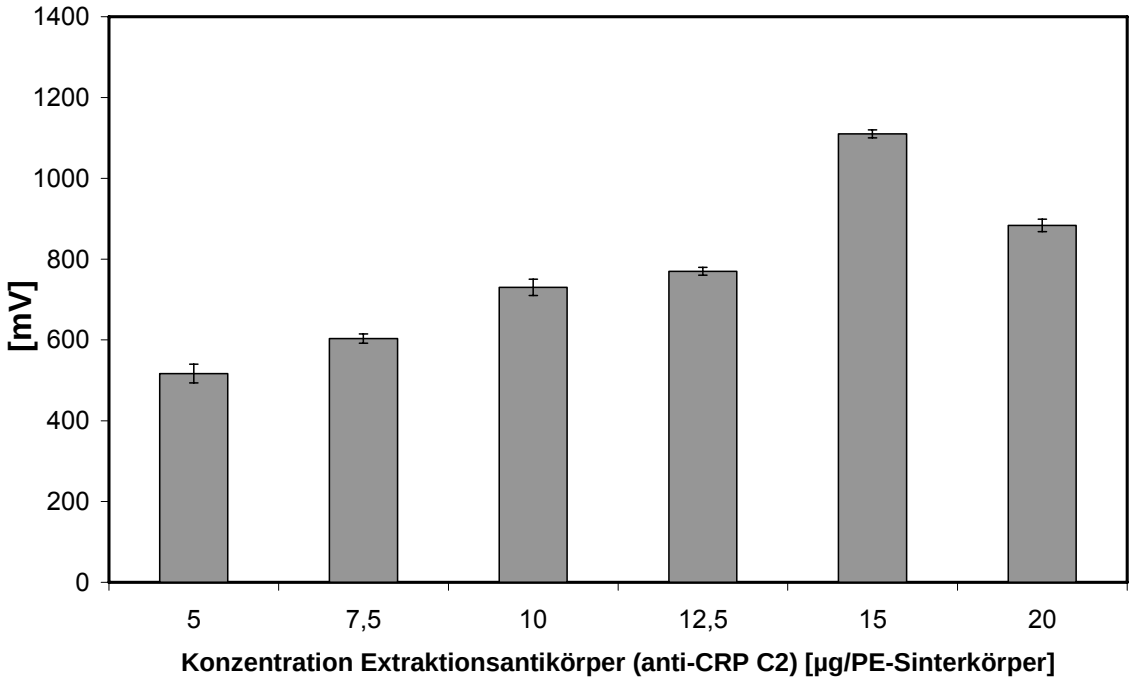


Abbildung 61 Variation der Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-CRP C2. Die Konzentration des Analyten CRP betrug 2,5 µg pro ml bei einem Probenvolumen von 500 µl, (n=3).

Eine Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-CRP C2 von 15 µg pro PE-Sinterkörper nach adsorbtiver Immobilisierung erscheint als Optimum. Analog zu diesem Test wurde die Konzentration des Detektionsantikörpers gekoppelt an die Magnetic Beads variiert.

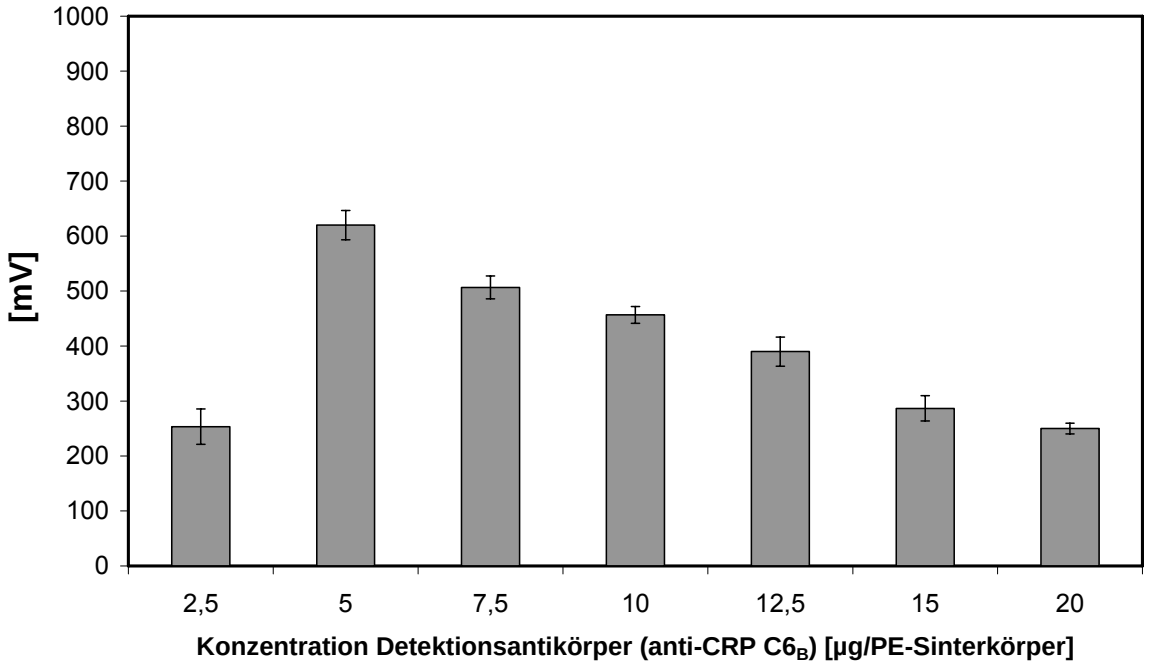


Abbildung 62 **Variation der Konzentration des Detektionsantikörpers anti-CRP C6B.** Die Konzentration des Analyten CRP betrug bei diesem Test 1,0 µg pro ml bei einem Probenvolumen von 500 µl, (n=3).

Hier erscheint eine Detektionsantikörperkonzentration von 5 µg anti-CRP $C6_B$ als optimal. Diese Konzentration ist im Vergleich zur optimalen Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-CRP C2 deutlich geringer; die Ursache kann in der Immobilisierung des Extraktionsantikörpers an den PE-Sinterkörper begründet liegen. Eine niedrige optimale Konzentration des Detektionsantikörpers anti-CRP $C6_B$ ist durchaus positiv, da dieser durch die Biotin-Funktion schwieriger herzustellen und kostenintensiver ist.

Als letzter Optimierungsschritt erfolgte die Testung verschiedener pH-Werte des Messpuffers. In Messpuffer wird die CRP-Probe verdünnt und durch die ABICAP®-Säule geleitet. Außerdem ist die Magnetic Bead-Lösung mit Detektionsantikörper in diesem Messpuffer verdünnt. Auch sämtliche Spülschritte werden mit diesem Messpuffer durchgeführt.

Zur Analyse der verschiedenen pH-Werte wurden die Extraktions- und Detektionsantikörper bereits in ihrer optimalen Konzentration von 15 µg pro PE-Sinterkörper anti-CRP C2 und 5 µg pro PE-Sinterkörper anti-CRP $C6_B$ eingesetzt. Die verwendeten Puffer hatten alle eine Konzentration von 0,15 M. Für die pH-Werte 6 bis 7,8

wurde PBS-Puffer verwendet, bei pH 8,5 und 9,5 kam Carbonat-Puffer zum Einsatz. Die Konzentration des Analyten betrug 2,5 µg pro ml bei einem Probenvolumen von 500 µl.

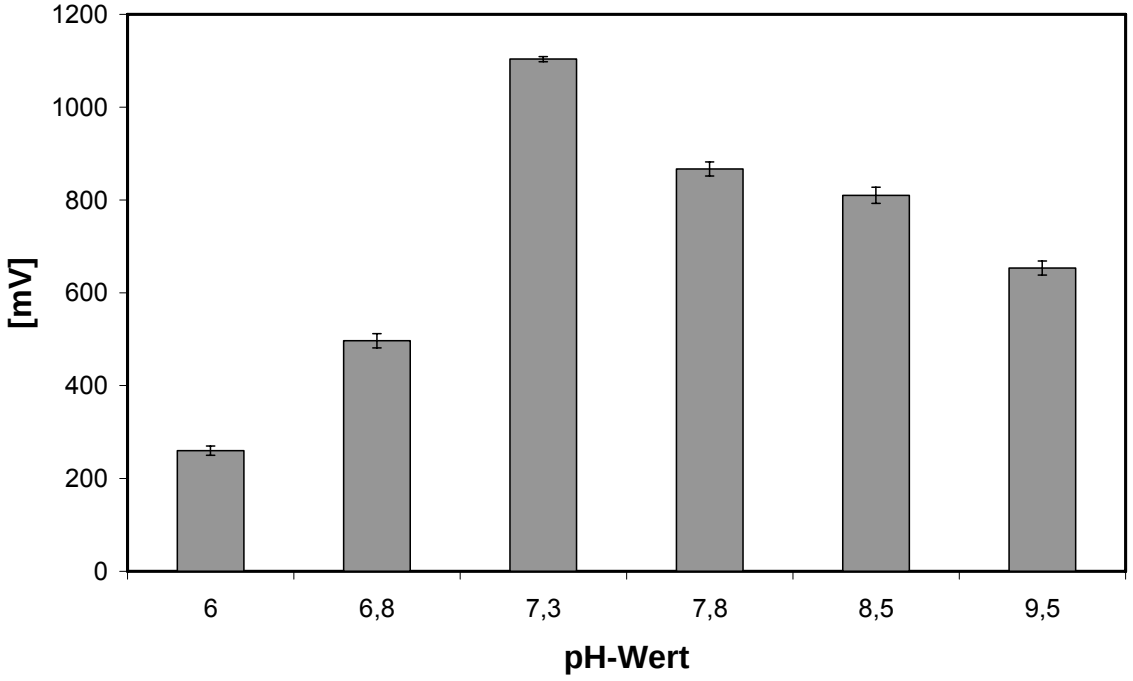


Abbildung 63 Variation der pH-Werte des 0,15 M Messpuffers im CRP-Assay. Bei pH 6 bis 7,8 wurde PBS-Puffer eingesetzt, pH 8,5 und 9,5 Carbonat-Puffer, (n=3).

Ergebnis dieser pH-Optimierung ist ein Messpuffer 0,15 M PBS pH 7,3. Auch dieser physiologische Puffer wird in vielen immunodiagnostischen Tests standardmäßig eingesetzt.

Als optimale Parameter für die Durchführung eines immunodiagnostischen Bioassays mit ABICAP®-Säulen und magnetischer Detektion wurden folgende Eigenschaften ermittelt. Die Immobilisierung des Extraktionsantikörpers erfolgte am effektivsten adsorptiv bei pH 9,5 in Carbonat-Puffer. Die optimale zu immobilisierende Konzentration betrug 15 µg Antikörper pro PE-Sinterkörper. Der ideale Messpuffer war 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3. Die optimierte Konzentration des Detektionsantikörpers anti-CRP $C6_B$ wurde bei 5 µg Antikörper pro Säulenequivalent an Magnetic Bead-Lösung festgestellt.
Als Ergebnis der Optimierung in Kap. 3.4.1 wurden Magnetic Beads vom Typ SAV1 (NCO) in einer Verdünnung von 1:100 (v/v) ermittelt. Diese wurden filtriert und mit 10 % (v/v) Caseinpuffer in Messpuffer verdünnt eingesetzt.

Nach Optimierung der Assay-Parameter konnte die Bestimmung einer Kalibrationsreihe der CRP-Detektion erfolgen. Es wurden alle optimierten Parameter beachtet. Die Kalibrationsreihe wurde durch Verdünnen des humanen CRP in Messpuffer (0,15 M PBS pH 7,3) erstellt. Es wurde das sequentielle Messverfahren angewendet. Die dargestellten Messwerte sind nach Abzug des Assay-Blindwertes (Hintergrundrauschen) ausgewertet worden.

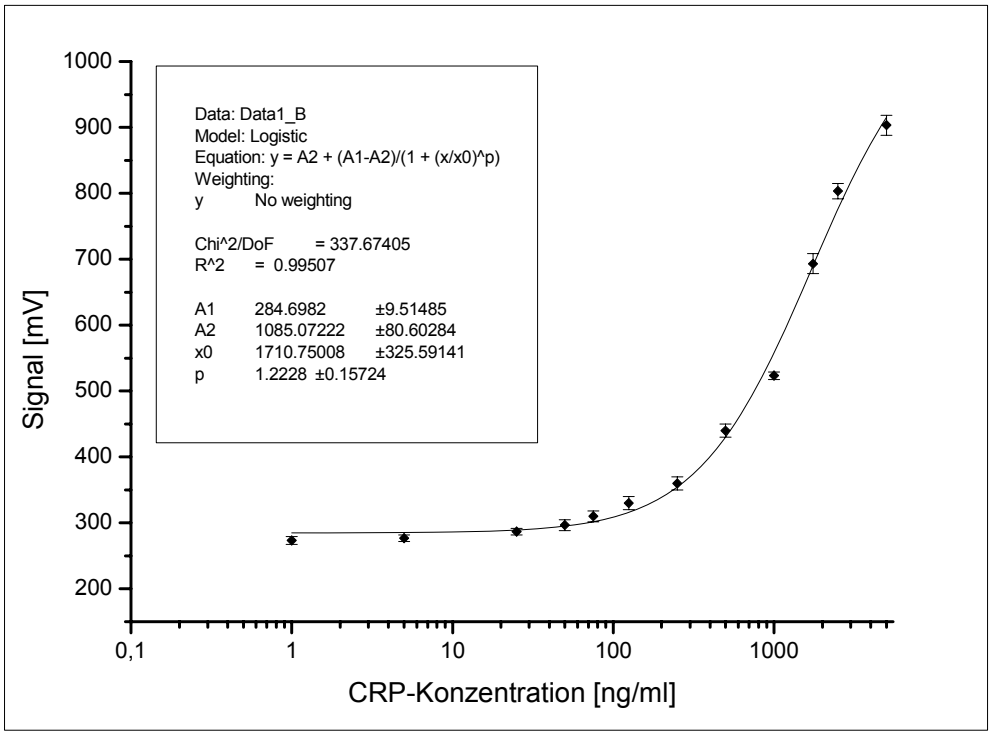


Abbildung 64 Kalibrationsreihe des CRP-Detektionssystems in PBS-Puffer. (Probenvolumen 500 µl, Blindwert (0 ng CRP/ml) = 230 mV, n=3)

Bei der Analyse der Kalibrationsreihe konnten zwei lineare Messbereiche identifiziert werden. Der gesamte Messbereich dieses Detektionssystems war 5 ng/ml bis 1,75 µg/ml bei einem Probenvolumen von 500 µl, unterteilt in zwei Kalibrationsbereiche. Ein Signal ist aufgrund der Nähe zum Rauschlimit des Magnet-Readers erst ab 5-10 ng/ml quantifizierbar.

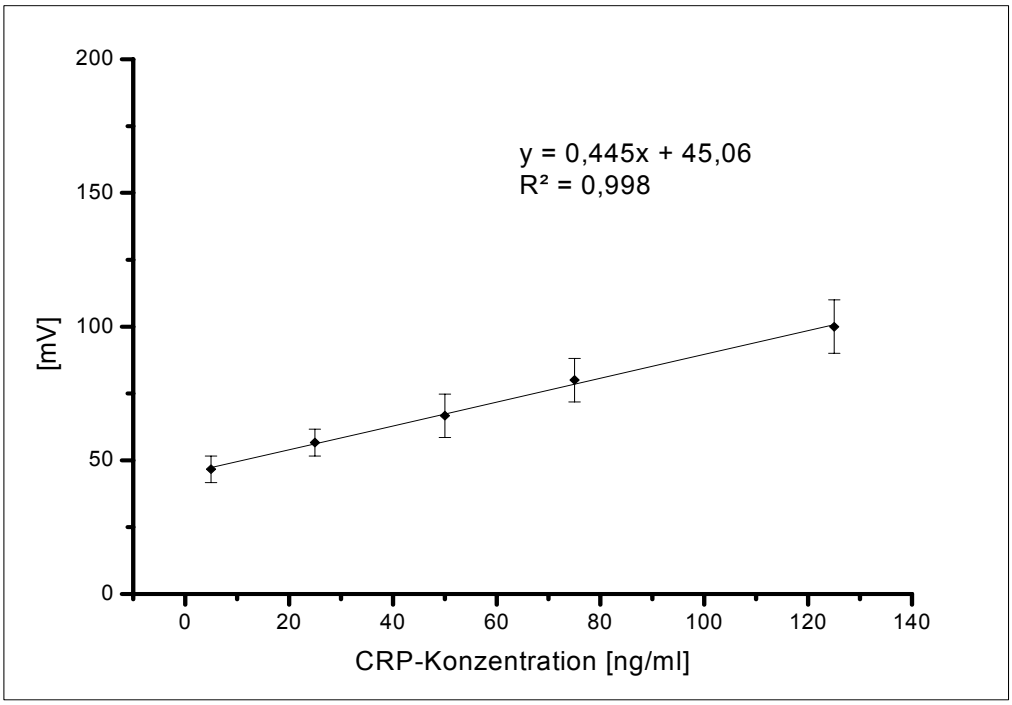


Abbildung 65 Kalibrationsreihe des CRP-Detektionssystems in PBS-Puffer für niedrige Analyt-Konzentrationen.

Der lineare Messbereich beträgt 5 – 125 ng/ml CRP. Die Linearität der Ausgleichsgerade ist mit 0,998 sehr hoch. Allerdings muss man die relativ hohen Standardabweichungen der Einzelwerte berücksichtigen.

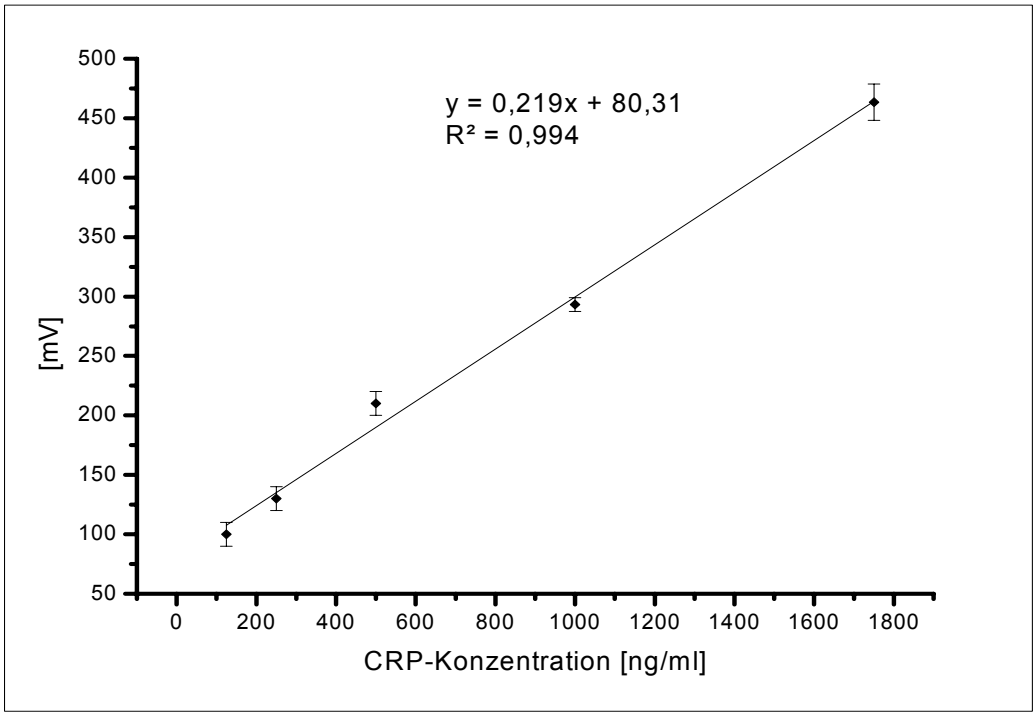


Abbildung 66 Kalibrationsreihe des CRP-Detektionssystems in PBS-Puffer für hohe Analyt-Konzentrationen.

Der lineare Messbereich dieser Kalibrationsreihe beträgt 125-1750 ng CRP pro ml. Die Linearität der Ausgleichsgerade ist mit 0,994 ebenfalls gut.

Zur Bestimmung der Standardabweichung und Verlässlichkeit des Systems wurde ein Intra-Assay durchgeführt. Hierzu wurden vier verschiedene CRP-Probenkonzentrationen von 0 ng/ml (Blindwert), 50 ng/ml, 250 ng/ml und 2500 ng/ml jeweils 12-mal bestimmt. Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse des Intra-Assays.

Tabelle 21 Bestimmung der Standardabweichung des CRP-Detektionssystems

Konzentration CRP [ng/ml]	Standardabweichung [%]
0 ng/ml (Blindwert)	9,4 %
50 ng/ml	10,5 %
250 ng/ml	5,9 %
2500 ng/ml	4,6 %
Gesamt	**7,6 %**

Die ermittelten Standardabweichungen sind gerade im niedrigen Konzentrationsbereich deutlich höher als bei höheren Konzentrationen. Trotzdem ist eine Standardabweichung von ca. 10 % bei immunodiagnostischen Tests noch akzeptabel, die Gesamtstandardabweichung von 7,6 % zeigt die gute Verlässlichkeit des gesamten Systems.

Zusätzlich erfolgte eine Testung der magnetischen Extraktions-Methode als Alternative zur sequentiellen Messung. Hierbei wurde eine Kalibrationsreihe der niedrigen CRP-Konzentrationen vermessen.

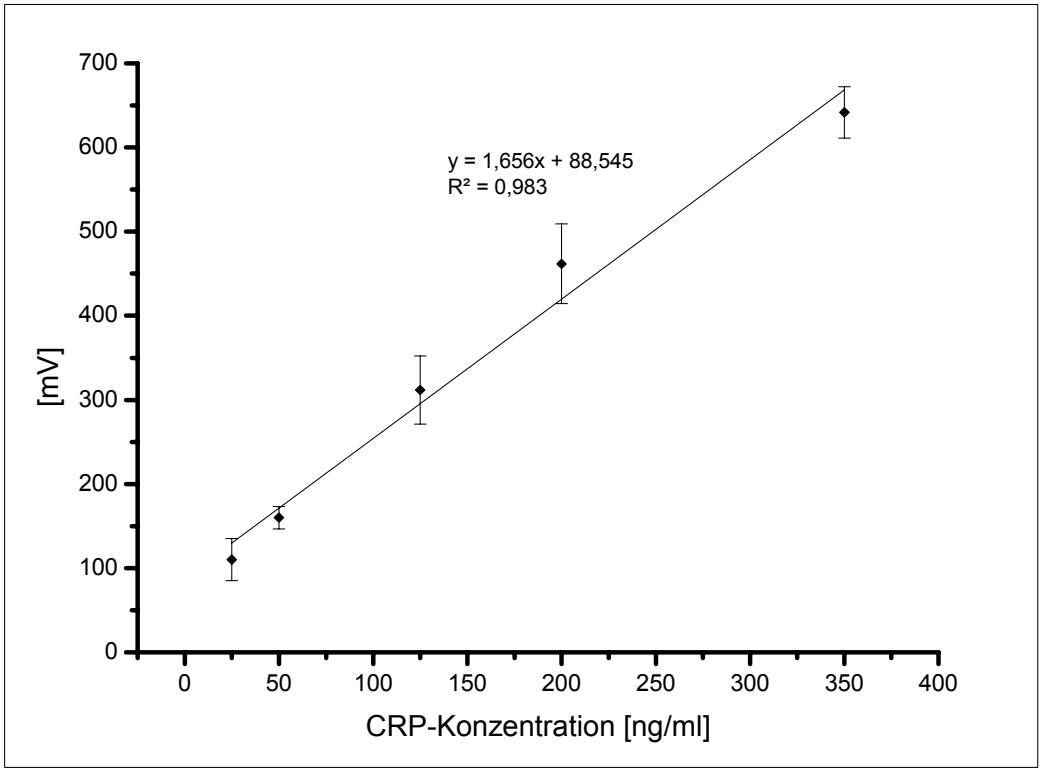


Abbildung 67 Kalibrationsreihe der CRP-Detektion mit magnetischer Extraktion. (Probenvolumen 500 µl).

Man erkennt deutlich höhere Signale im Vergleich zur sequentiellen Detektion. Dies liegt in der Messmethode der magnetischen Extraktion begründet, hier wird keine vorfiltrierte Magnetic Beads-Lösung eingesetzt. Die Kontaktzeit zwischen Analyt und Antikörper-

Magnetic Bead-Konjugat hier deutlich länger. Die magnetische Extraktion kann also als Detektionsystem in der CRP-Diagnostik ebenfalls angewendet werden.

3.4.3 Übertragung des CRP-Detektionssystems auf Realmatrices

Zur tatsächlichen Bestimmung der Leistungsfähigkeit des CRP-Detektionsssystems mit magnetischer Detektion muss eine Anwendung in Realmatrices erfolgen. Die Bestimmung von CRP in PBS-Puffer ist zwar zur Optimierung und Vergleichen innerhalb des Systems sinnvoll, eine tatsächliche Diagnostik in PBS-Puffer ist allerdings nicht praktikabel. Hierfür müsste das CRP aus Realproben erst extrahiert und dann in PBS-Puffer vermessen werden.

Die tatsächliche CRP-Diagnostik erfolgt dagegen fast auschließlich in Blutserum. Daher wurde testweise eine Standardreihe in humanem Blutserum bestimmt. Diese deckt die besonders interessanten niedrigen CRP-Konzentrationen ab.
Weitere interessante Probenmatrices in der CRP-Diagnostik sind Speichel (Saliva) und Urin. In allen diesen Matrices kann CRP bei entzündlichen Prozessen vorkommen. Gerade diese Matrices waren aufgrund ihrer Zusammensetzung, pH-Wertes oder Textur bisher für CRP-Bestimmungen im ELISA-Verfahren nicht zugänglich. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit jeweils eine Test-Kalibrationsreihe für diese drei zusätzlichen Matrices bestimmt und verglichen. Die Messung in humanem Blutserum, Urin und Saliva erfolgte sequentiell. Da für alle Probenmatrices keine real unterschiedlichen CRP-Proben erhältlich waren, wurde das CRP in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt.

3.4.3.1 Bestimmung von CRP in humanem Blutserum

Die Bestimmung von CRP in humanem Blutserum erfolgte mit kommerziell erhältlichem Bluserum. Da das Blutserum jedes Menschen durch permanent vorhandene Immunreaktionen auch CRP enthält, konnte nur dotiertes CRP detektiert werden. Eine vorherige quantitative Abtrennung des CRP aus dem erhaltenen Blutserum war nicht erfolgreich. Eine Bestimmung des nativen CRP-Gehaltes brachte einen Wert von ca. 1 µg pro ml im unbehandelten, gepooltem Blutserum.
Die Bestimmung des CRP erfolgte im sequentiellen Verfahren und mit magnetischer Extraktion. Es wurden alle optimierten Parameter des Assays beachtet.

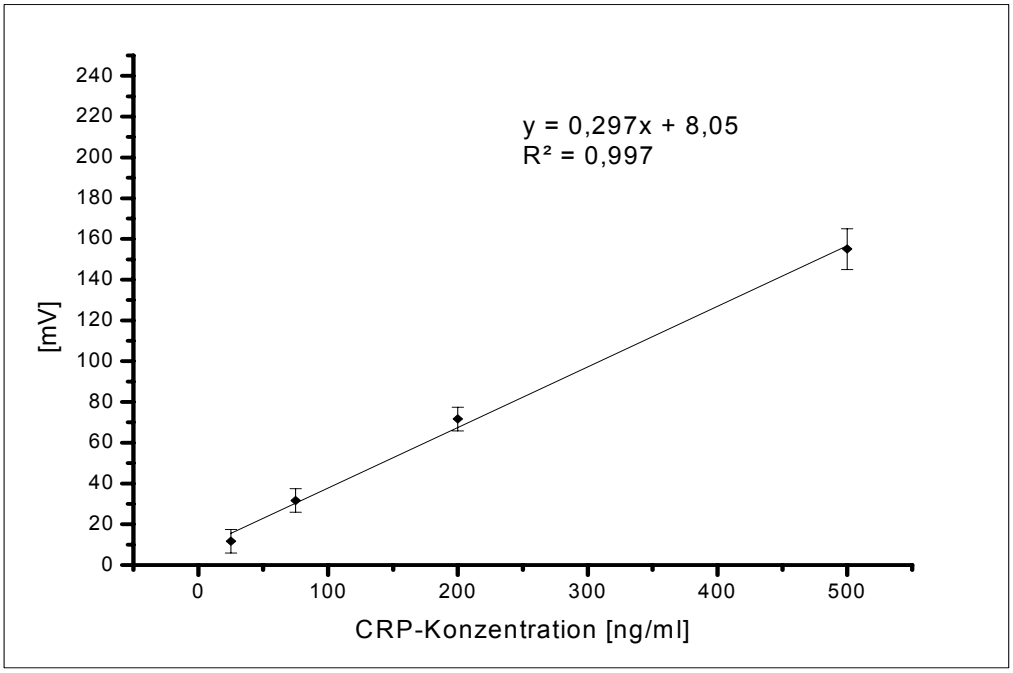


Abbildung 68 Kalibrationsreihe des CRP-Detektionssystems mit sequentieller Messung in humanem Blutserum. Das Probenvolumen betrug 500 µl.

Die dargestellten Messwerte sind nach Abzug des Blindwertes ausgewertet worden. Eine Bestimmung von dotiertem CRP in humanem Blutserum ist möglich und von hoher Sensitivität. Hierbei kann eine gute Standardabweichungen und Linearität der Ausgleichsgerade beobachtet werden. Der getestete Messbereich betrug 25-500 ng CRP pro ml.

Auch die magnetische Extraktionsmethode erlaubt eine Bestimmung von CRP direkt in humanem Blutserum. Vorteil dieser Methode ist die Einfachheit und Geschwindigkeit der Messung. Nachteil ist die hier ebenfalls erkennbare höhere Standardabweichung der Einzelproben und dadurch schlechtere Linearität der Ausgleichsgeraden. Die insgesamt deutlich höheren Messsignale sind durch die besonderen Eigenschaften der magnetischen Extraktion bedingt (s. o.).

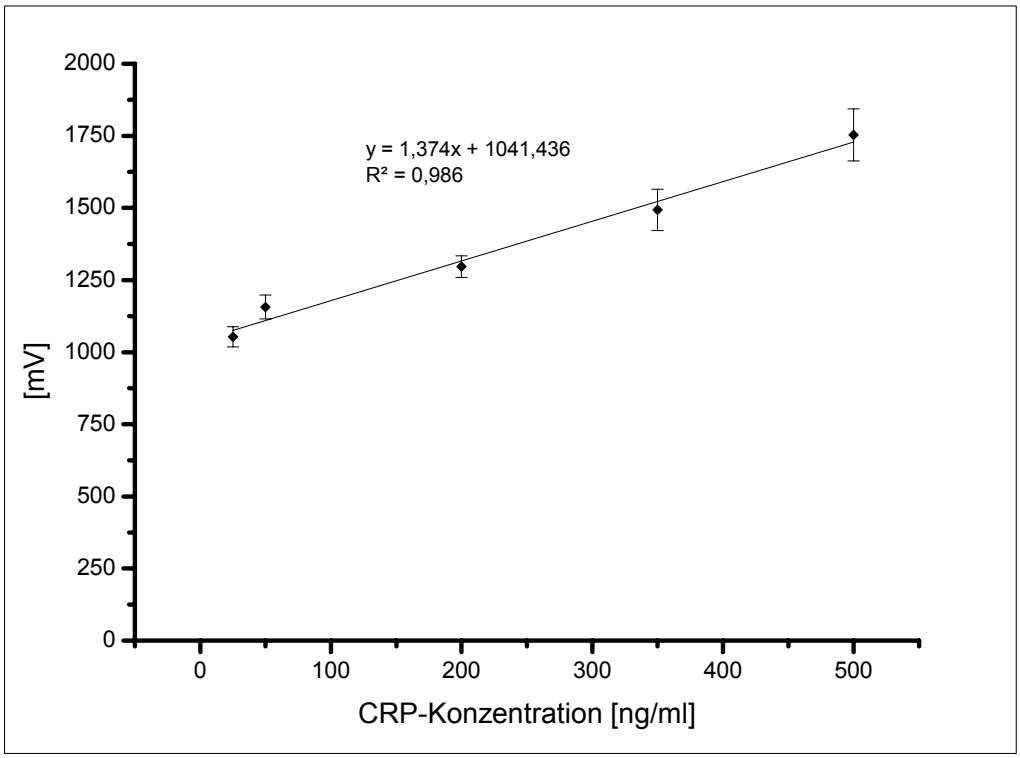


Abbildung 69 Kalibrationsreihe des CRP-Detektionssystems mit magnetischer Extraktion in humanem Blutserum. Das Probenvolumen betrug 500 µl. Der getestete Messbereich war 25-500 ng CRP pro ml.

3.4.3.2 Bestimmung von CRP in humaner Saliva und Urin

Die Bestimmung von CRP in Speichel (Saliva) ist eine interessante neue Methode der Detektion einer versteckten Paradontose bzw. Gingivitis. Entzündliche Prozesse des Zahnfleisches und der Mundschleimhaut, auch in nicht einsehbaren Bereichen der Mundhöhle, können so entdeckt werden. Die Bestimmung von CRP in Saliva erfolgte durch Dotieren von Saliva mit CRP. Der Speichel wurde freundlicherweise von der Zahnheilkunde der Universität Bonn, Prof. Frentzen, zur Verfügung gestellt. Die native CRP-Konzentration der Saliva betrug ca. 50 ng/ml, es handelt sich um gepoolte Proben. Es wurde im sequentiellen Messverfahren gemessen, das Probenvolumen betrug 500 µl. Abb. 70 zeigt eine Testreihe für die Detektion von CRP in Saliva.

Auch die Ermittlung des CRP-Gehaltes in Urin ist noch nicht etabliert, wird aber in der Forschung bereits diskutiert. Während die Bestimmung einer Blasenentzündung symptomatisch noch relativ einfach ist, können die wenigen Symptome von Blasenkrebs

und Harnleiterkrebs erst in einem fortgeschrittenen Zustand der Entartung erkannt werden. Da in diesen Fällen, wie bei der Blasenentzündung, CRP in geringen Mengen im Urin nachzuweisen ist, wurde ein Einsatz des CRP-Detektionssystems in Urin getestet.

Bei der verwendeten Urinprobe handelte es sich um Morgenurin einer einzelnen, symptomatisch unauffälligen Testperson. Im Urin war kein CRP enthalten. Das zu detektierende CRP für eine Kalibrationsreihe wurde dotiert. Erste Versuche zeigten, das der pH im Bereich pH 7,5 lag und daher als Probe nicht gepuffert werden musste. Bei Urinproben mit pH-Werten, die stark vom optimalen pH-Wert des Assays (pH 7,3) abweichen, sollte die Probe gepuffert werden. Abb. 70 zeigt die Testreihe dieser Messung.

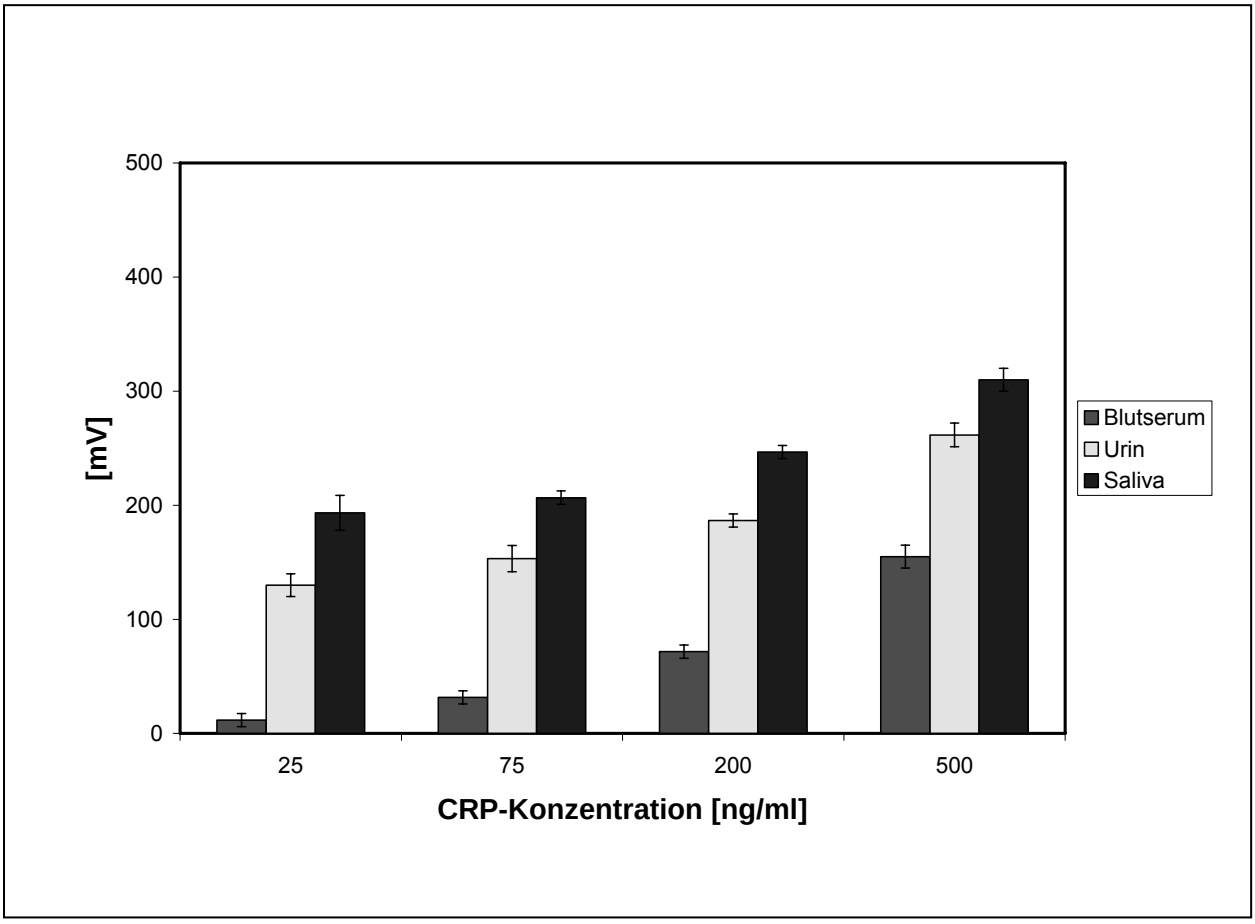


Abbildung 70 Standardreihe des CRP-Detektionssystems mit sequentieller Messung in Blutserum, Saliva und Urin. (n=3)

Die Abbildung zeigt, dass das Bestimmen einer CRP-Konzentration in humaner Saliva möglich ist. Der geteste Detektionsbereich war 25-500 ng CRP pro ml. Die Standardabweichungen sind im Vergleich zur Detektion von CRP in humanem Blutserum etwas schlechter. Die Messung zeigte außerdem, dass eine Messung der CRP-Konzentration in Urin ebenfalls möglich ist.

3.4.4 Vergleich der Sensorsysteme

Im Zuge der technischen Weiterentwicklung des Magnetsensors wurde vom Forschungszentrum Jülich ein zweiter und modifizierter Magnetsensor vorgelegt. Der modifizierte Sensor verfügte über einen permanenten Leerwert-Abgleich, so dass der Leerwert nicht mehr manuell abgezogen werden musste. Weiterhin verfügte der Sensor über eine programmierte Datenaufzeichnung, die jeweils 20 hintereinander gemessene Einzelwerte einer Probe vermaß und anschließend den errechneten Mittelwert als Messwert ausgab. Hierdurch sollte die Standardabweichung der einzelnen Proben nochmals verringert werden.

Zur Testung beider Systeme wurde der bereits beschriebene CRP-Assay mit sequentieller Durchführung in PBS-Puffer verwendet. Die Durchführung des Assays erfolgte analog zu Kap. 3.4.2. Es wurde jeweils der niedrige und hohe Detektionsbereich beider Sensoren parallel vermessen. Abb. 71 zeigt den niedrigen linearen Detektionsbereich des alten Prototyp-Messkopfes.

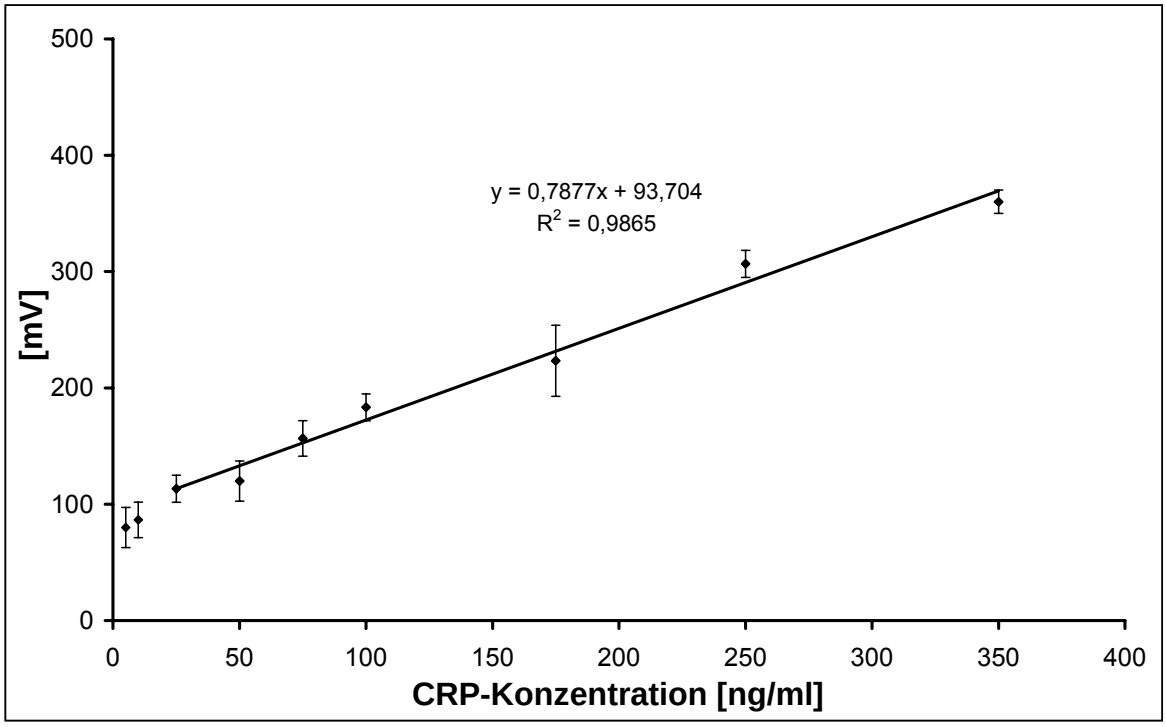


Abbildung 71 Linearer Detektionsbereich des Prototyp-Sensors im CRP-Assay.

Das Detektionslimit (Limit of Detection – LOD) bezeichnet den Blindwert (Messung ohne Analyt) plus die dreifache Standardabweichung des Blindwertes. Das LOD für diesen Assay mit dem Prototyp-Sensor liegt bei 5 ng CRP pro ml. Das Quantifikationslimit (Limit of Quantification – LOQ) bezeichnet den Beginn des quantifizierbaren Bereiches und ist als Blindwert plus 10-fache Standardabweichung des Blindwertes definiert. Für diesen Sensor beträgt es 25 ng CRP/ml.

Analog stellt Abb. 72 den niedrigen linearen Detektionsbereich dieses Assays mit dem modifizierten Sensor dar.

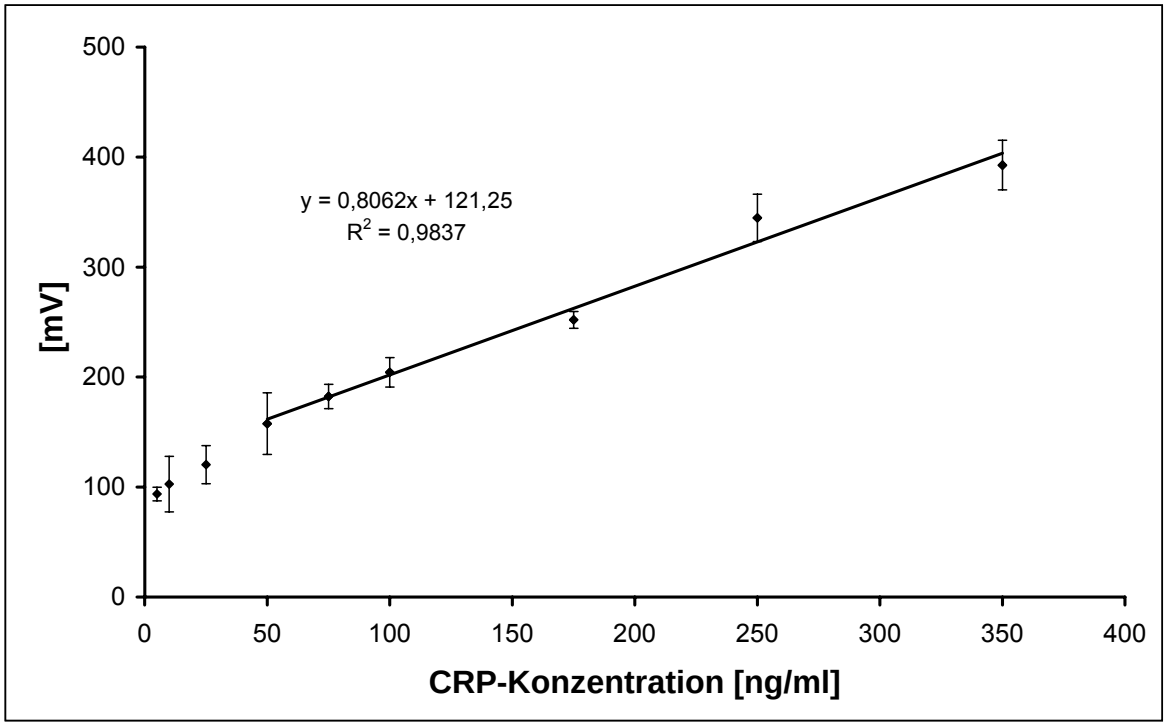


Abbildung 72 Linearer Detektionsbereich des modifizierten Sensors im CRP-Assay.

Das Detektionslimit liegt ebenfalls bei 5 ng CRP pro ml. Durch eine erhöhte Standardabweichung des Blindwertes bei diesem Sensorsystem (4,2% im Vergleich zu 2% beim Prototyp-Sensor) beginnt der quantifizierbare Bereich (LOQ) hier erst ab 50 ng CRP/ml. Die Bestimmtheit der Ausgleichsgeraden ist bei beiden Systemen vergleichbar, allerdings weist der modifizierte Sensor als positive Eigenschaft eine gering erhöhte Steigung der Ausgleichsgeraden auf.

Weiterhin wurden die linearen Detektionsbereiche für hohe CRP-Konzentrationen verglichen.

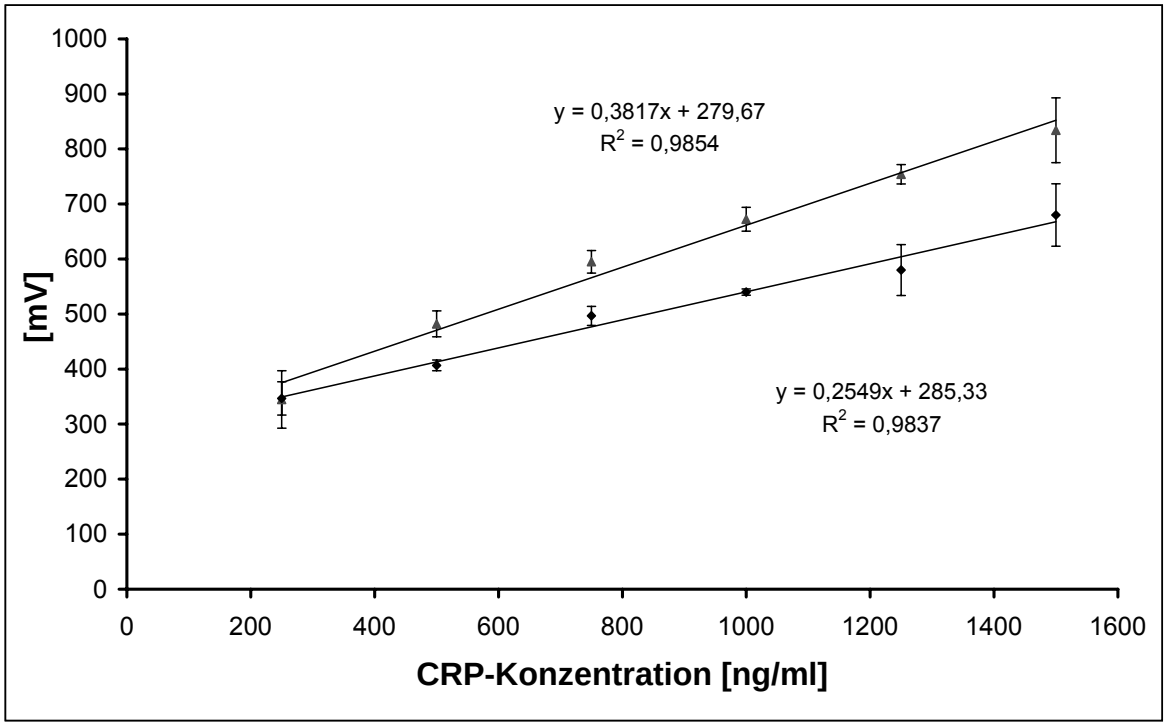


Abbildung 73 Vergleich lineare Detektionsbereiche für hohe CRP-Konzentrationen (Dreieck = modifizierter Sensor, Raute= Prototyp-Sensor).

Die Linearität beider Kalibrationsgeraden ist vergleichbar. Die Steigung der ausgleichsgerade des modifizierten Sensors ist wieder steiler. In diesem Fall ist der Effekt deutlich ausgeprägter als bei den niedrigen CRP-Konzentrationen und ermöglicht eine bessere Trennung der Einzelwerte.

3.5 Screening alternativer Magnetpartikel

Das Screening von Magnetpartikeln verschiedener Hersteller wurde zur Erlangung vergleichbarer und belastbarer Aussagen mit dem bereits mehrfach beschriebenen CRP-Assay durchgeführt.
Als Vereinfachung wurde der Assay weder sequentiell noch per magnetischer Extraktion durchgeführt, sondern als Komplettansatz (batch). Hierbei wurden verschiedene CRP-Konzentrationen in Pufferlösung hergestellt und jeweils 500 µl der CRP-haltigen Pufferlösung mit jeweils 10 µg biotinyliertem anti-CRP C2 Antikörper und einer definierten Menge Magnetic Beads versetzt. Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde leicht schüttelnd inkubiert (300 rpm im EppiCap-Ständer). Anschließend folgte eine magnetische Abtrennung der Magnetpartikel (5 min) mithilfe eines magnetischen EppiCap-Ständers, um die magnetische Extrahierbarkeit der Partikel aus einer Probe zu bestimmen.

Die abgetrennten Partikel wurden per Durchmischung wieder resuspendiert und anschließend durch die bereits fertig mit antiCRP C6-Antikörper beschichtete ABICAP®-Säule gegeben. Auch dieser Schritt wurde für 1 h inkubiert und anschließend mit 500 µl PBS-Puffer gespült.
Im Anschluss daran erfolgte die Vermessung der Säule im Magnet Reader. Die folgenden Abbildungen zeigen die jeweils bestimmten Konzentrations-Testreihen, eine zusammenfassende Übersicht ist in Tabelle 22 gegegeben.

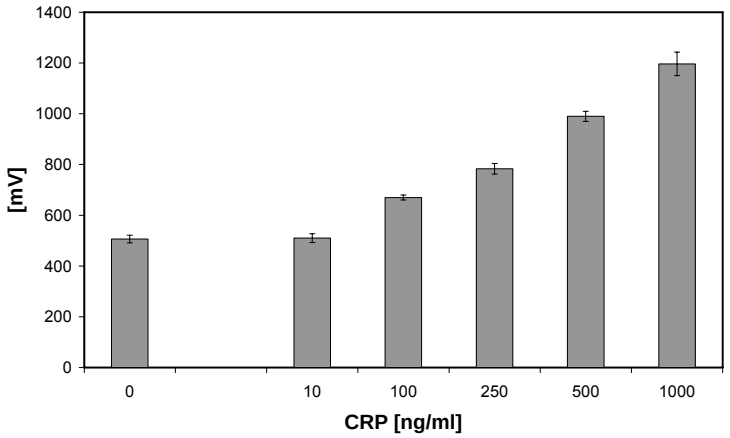


Abbildung 74 Konzentrations-Testreihe Dynal M-270 (v/v 1:50). Blindwert (0 ng CRP/ml) ist eine Probe ohne Analyt. (n=3)

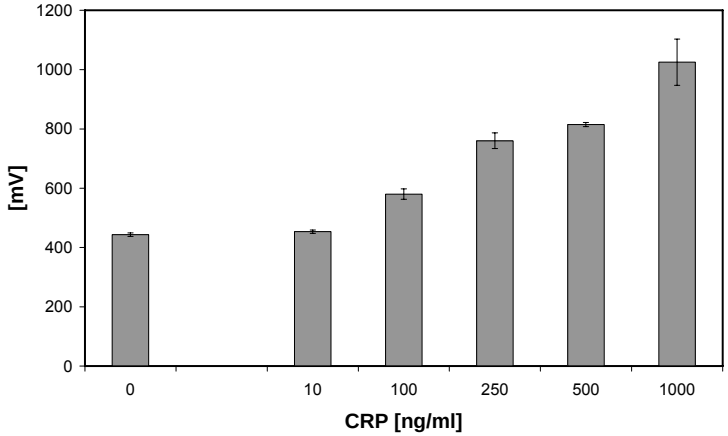


Abbildung 75 Konzentrations-Testreihe Dynal M-280 (v/v 1:50). Blindwert (0 ng CRP/ml) ist eine Probe ohne Analyt. (n=3)

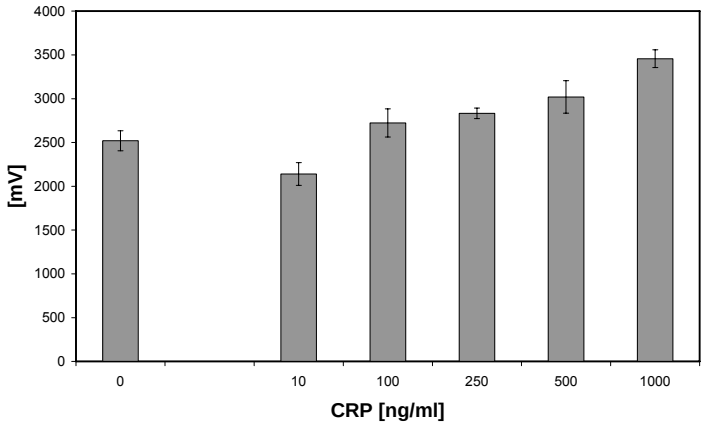


Abbildung 76 Konzentrations-Testreihe Dynal C1 (v/v 1:50). Blindwert (0 ng CRP/ml) ist eine Probe ohne Analyt. (n=3)

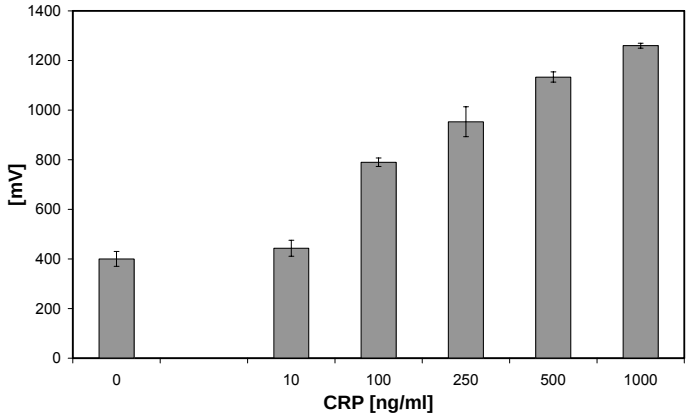


Abbildung 77 Konzentrations-Testreihe Dynal T1 (v/v 1:50). Blindwert (0 ng CRP/ml) ist eine Probe ohne Analyt. (n=3)

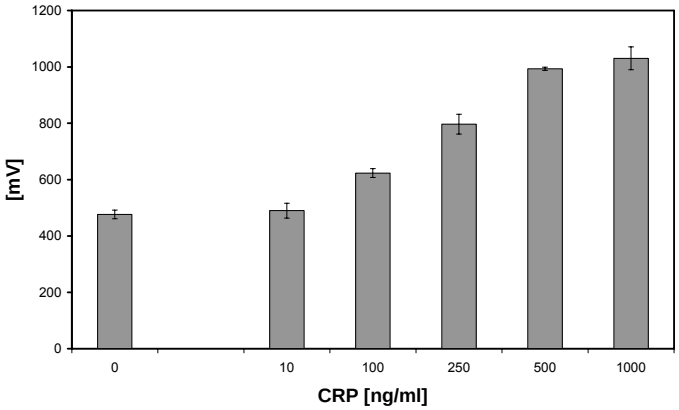


Abbildung 78 **Konzentrations-Testreihe Estapor BM 2,6 (v/v 1:100).** Blindwert (0 ng CRP/ml) ist eine Probe ohne Analyt. (n=3)

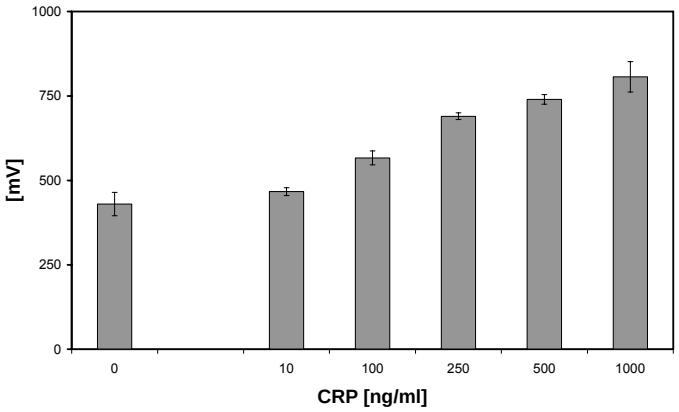


Abbildung 79 **Konzentrations-Testreihe Estapor BM 0,86 (v/v 1:100).** Blindwert (0 ng CRP/ml) ist eine Probe ohne Analyt. (n=3)

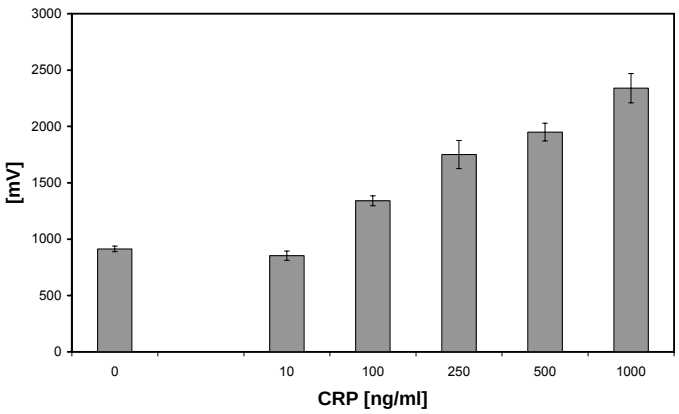


Abbildung 80 **Konzentrations-Testreihe Estapor BM 0,3 (v/v 1:100).** Blindwert (0 ng CRP/ml) ist eine Probe ohne Analyt. (n=3)

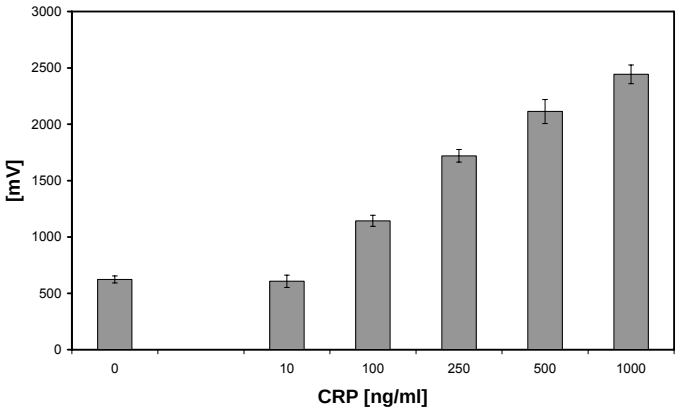


Abbildung 81 **Konzentrations-Testreihe Estapor BM 0,2 (v/v 1:100).** Blindwert (0 ng CRP/ml) ist eine Probe ohne Analyt. (n=3)

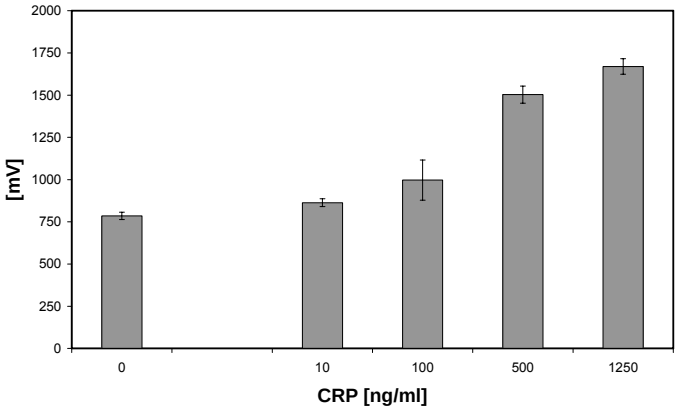


Abbildung 82 **Konzentrations-Testreihe Magnamedics MagSI 0,6 (v/v 1:100**). Blindwert (0 ng CRP/ml) ist eine Probe ohne Analyt. (n=3)

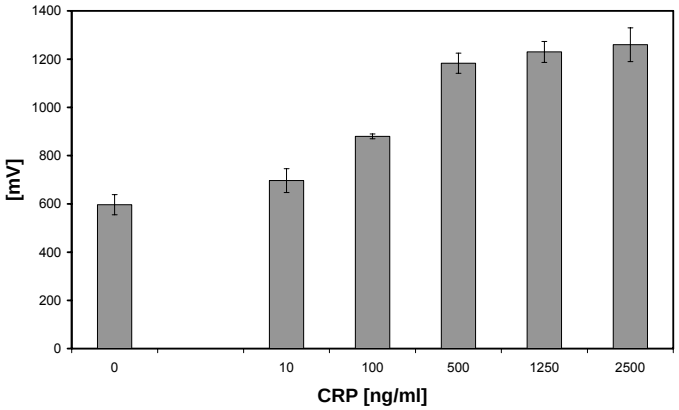


Abbildung 83 **Konzentrations-Testreihe Magnamedics MagSI 1,0 (v/v 1:100).** Blindwert (0 ng CRP/ml) ist eine Probe ohne Analyt. (n=3)

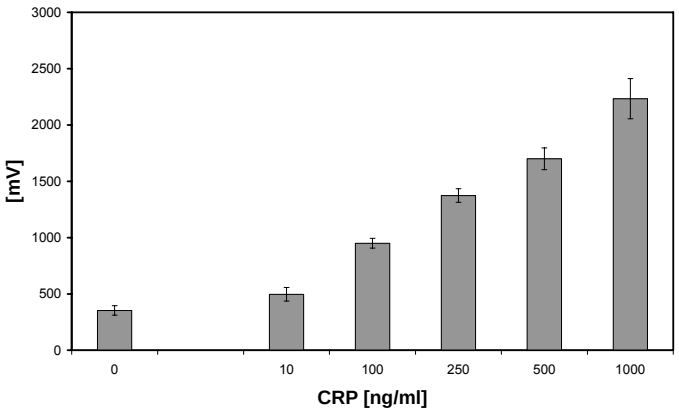


Abbildung 84 Konzentrations-Testreihe Seradyn MGSA 0,75 (v/v 1:100). Blindwert (0 ng CRP/ml) ist eine Probe ohne Analyt. (n=3)

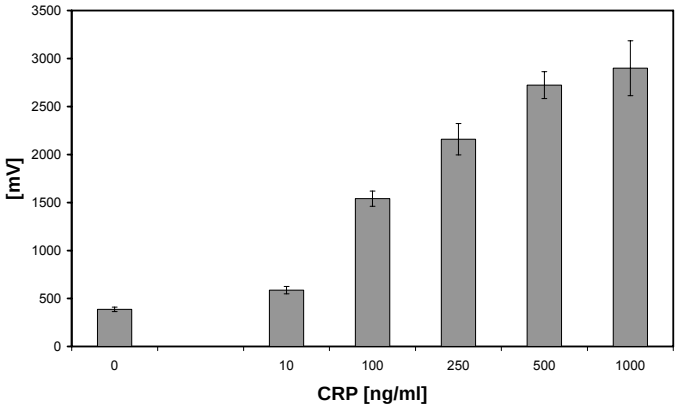


Abbildung 85 Konzentrations-Testreihe Seradyn dsMGSA 1,3 (v/v 1:100). Blindwert (0 ng CRP/ml) ist eine Probe ohne Analyt. (n=3)

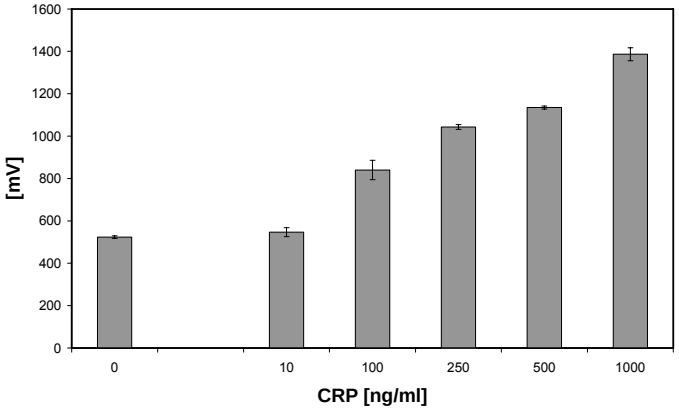


Abbildung 86 Konzentrations-Testreihe chemagen SAV1 (NCO) 0,5-1 (v/v 1:100). Blindwert (0 ng CRP/ml) ist eine Probe ohne Analyt, Vergleich ursprüngliche Partikel.

Die Partikel SiMAG 1.0 und fluidMAG 0.2 des Hersteller Chemicell (Berlin) hatten eine ausgeprägte unspezifische Affinität zum PE-Filter der ABICAP®-Säulen. Eine spezifische Verwendung dieser Partikel war nicht möglich.

Tabelle 22 Vergleich der getesteten Magnetpartikel

Partikeltyp	Verd.	Magn. Extrah.	Signaldrift (8 min)	Initiale Steigung	Blindwert (o. Analyt)
SAV1 (NCO) alte Version	1:100	+	15 %	2,0	500 mV
Dynal M-270	1:50	+	nein	1,1	500 mV
Dynal M-280	1:50	+	nein	1,3	440 mV
Dynal C1	1:50	+	3,6 %	6,4	2500 mV
Dynal T1	1:50	+	7,5 %	3,8	400 mV
Estapor BM 2,6	1:100	+	nein	1,3	480 mV
Estapor BM 0,9	1:100	+	nein	0,9	420 mV
Estapor BM 0,3	1:100	O	nein	3,6	910 mV
Estapor BM 0,2	1:100	-	nein	4,6	620 mV
Magnamedics MagSI 0,6	1:100	+	2,7 %	1,3	790 mV
Magnamedics MagSI 1,0	1:100	+	10,1 %	0,9	600 mV
Chemicell SiMAG 1,0	1:100	O	X (Affinität)	X (Affinität)	X (Affinität)
Chemicell fluidMAG 0,2	1:100	-	X (Affinität)	X (Affinität)	X (Affinität)
Seradyn MGSA 0,7	1:100	+	10 %	3,6	360 mV
Seradyn dsMGSA 1,3	1:100	+	10,8 %	6,3	380 mV

Die angegebene Verdünnung erfolgte aus der Ursprungslösung des Herstellers und wurde mit PBS-Puffer durchgeführt. Die Testung der magnetischen Extrahierbarkeit erfolgte wie bereits angeführt mithilfe eines EppiCap-Magnetständers innerhalb von 5 Minuten. Die Signaldrift beschreibt die Signalsteigerung des aufgezeichneten Sensorsignals während einer 8-minütigen Dauermessung.
Als Steigung ist die Steigung einer Ausgleichsgeraden der Test-Kalibrationsreihe angeführt innerhalb der initialen linearen Bereiche.
Der angegebene Blindwert ist wiederum ein Messwert ohne Zugabe von Analyt.

Man erkennt teilweise extreme Unterschiede der einzelnen Partikel in Bezug auf ihrer Verwendbarkeit für das ABICAP®-System.

In Berücksichtigung der Eigenschaften Blindwert (möglichst niedrig), Signaldrift (möglichst niedrig) und initiale Steigung (möglichst hoch), wurden die Partikel Dynal M-270, Dynal T1, Estapor BM 2,6 und Seradyn dsMGSA 1,3 in einem weiteren Kalibrationsversuch zusätzlich getestet. Dem Partikel Dynal M-270 wurde gegenüber dem vermeintlich besseren Partikel M-280 der Vorzug gegeben, da die Standardabweichungen der Kalibrations-Testreihe niedriger waren.

3.5.1 Kalibrationsversuche mit neuen Magnetpartikeln

Alle Kalibrationen wurden wie bereits beschrieben durchgeführt. Es wurde der CRP-Assay mit den jeweils optimalen Parametern angewendet.

3.5.1.1 Kalibration mit Dynal M-270

Es wurde folgende Kalibrationsgerade bestimmt.

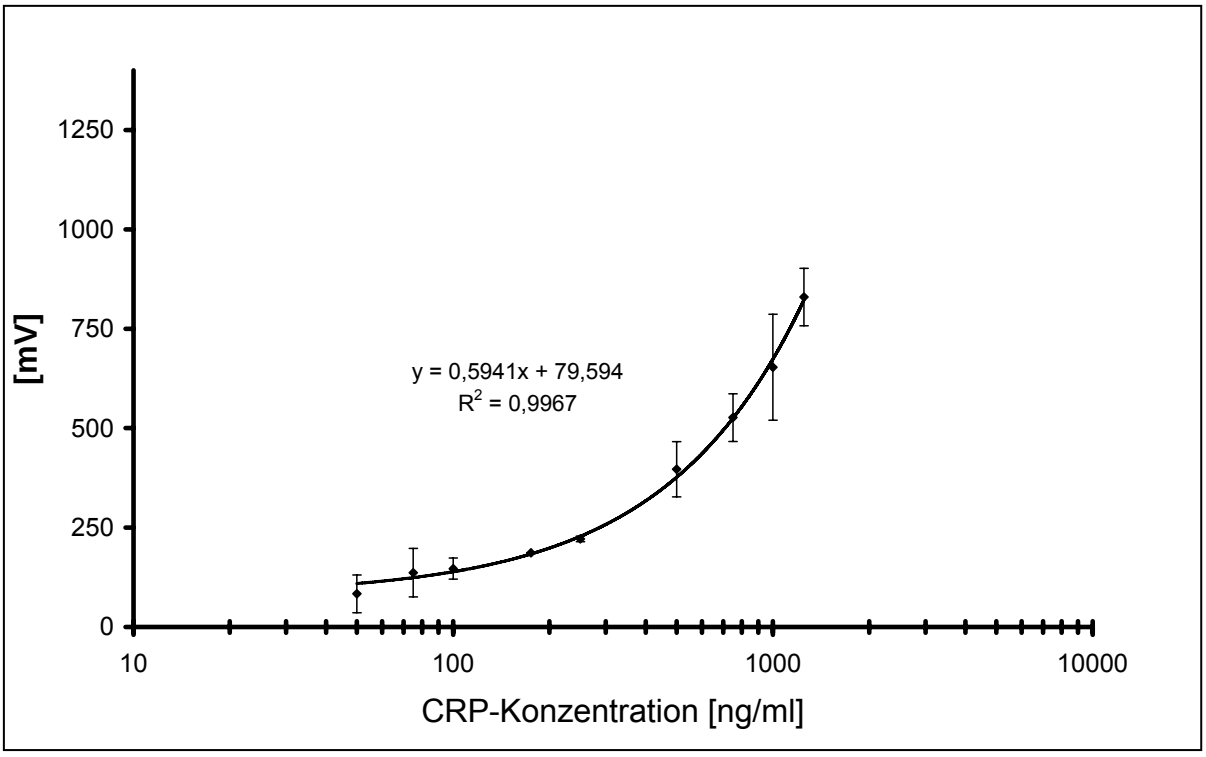


Abbildung 87 Kalibrationsreihe des CRP-Assays in PBS-Puffer mit Dynal M-270 Magnetpartikeln. (n=3)

Man erkennt eine sehr gute Linearität der linearen Ausgleichsgeraden und eine zufrieden stellende Signalhöhe von max. 800 mV. Allerdings sind die Standardabweichungen der Einzelwerte teilweise sehr hoch. Entgegen der allgemeinen Durchführung des CRP-Assays führte eine Zugabe von Caseinpuffer hier zu einer Verschlechterung der Standardabweichungen. Die dargestellte Kalibration erfolgte dementsprechend ohne Caseinpuffer.

3.5.1.2 Kalibration mit Dynal T1

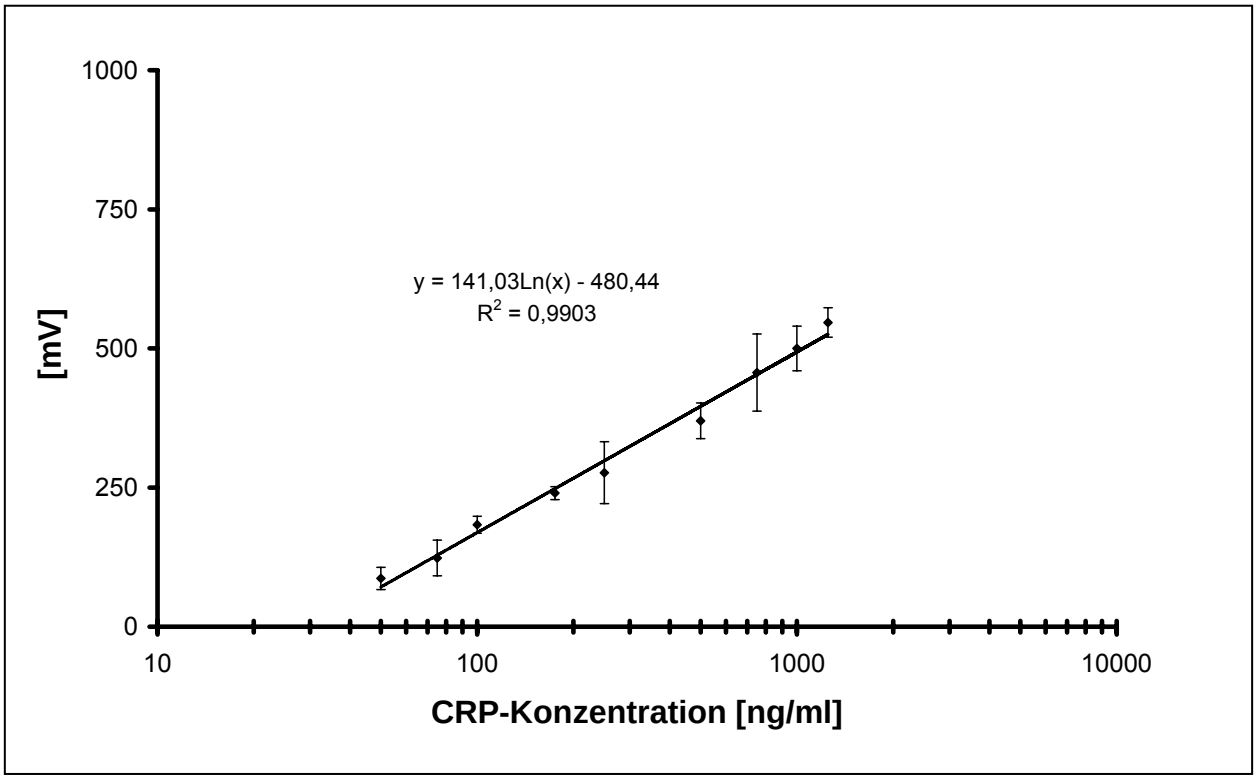


Abbildung 88 Kalibrationsreihe des CRP-Assays in PBS-Puffer mit Dynal M-270 Magnetpartikeln. (n=3)

Man erkennt eine sehr gute Linearität der in diesem Fall logarithmischen Ausgleichsgeraden. Die Signalhöhe ist mit max. 550 mV recht gering, eine analytische Anwendung ist aber denkbar.

3.5.1.3 Kalibration mit Estapor BM 2,6

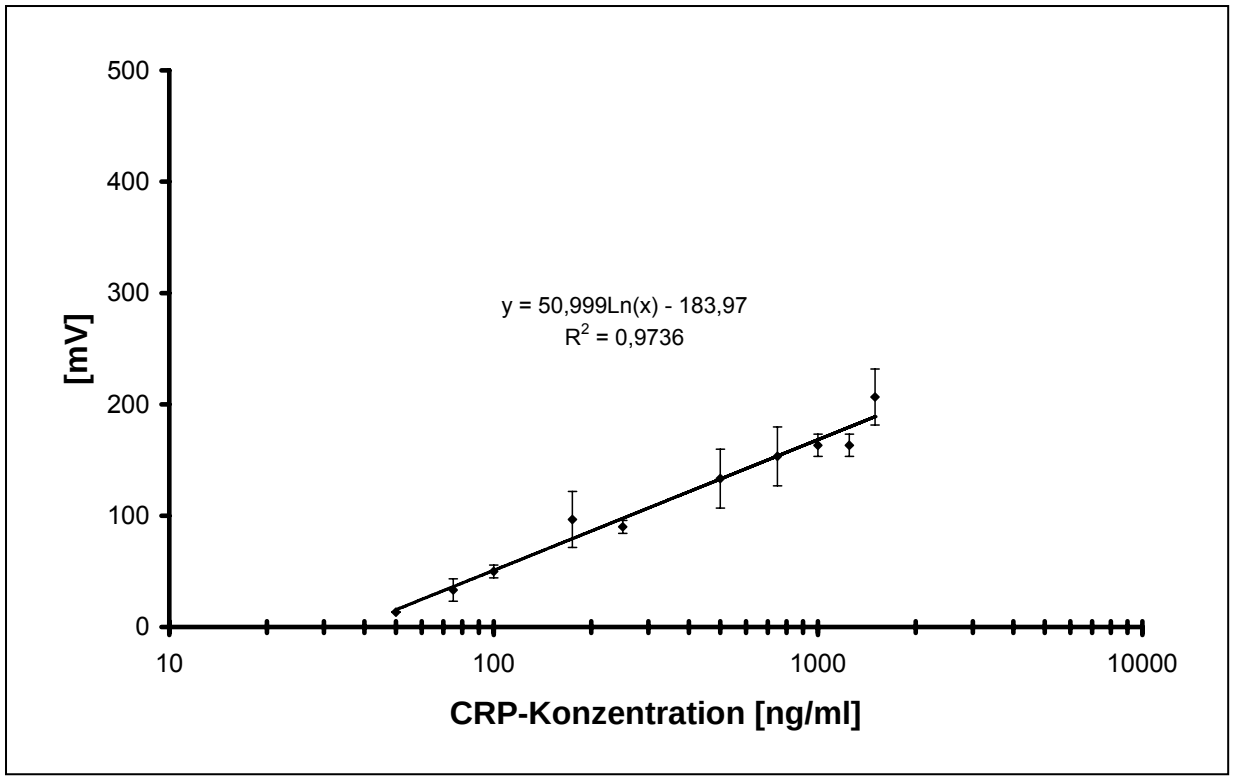


Abbildung 89 Kalibrationsreihe des CRP-Assays in PBS-Puffer mit Estapor BM 2,6 Magnetpartikeln. (n=3)

Man erkennt eine noch gute Linearität der auch in diesem Fall logarithmischen Ausgleichsgeraden. Die Signalhöhe ist mit max. 200 mV viel zu gering für eine sinnvolle analytische Verwendung.

3.5.1.4 Kalibration mit Seradyn dsMGSA 1,3

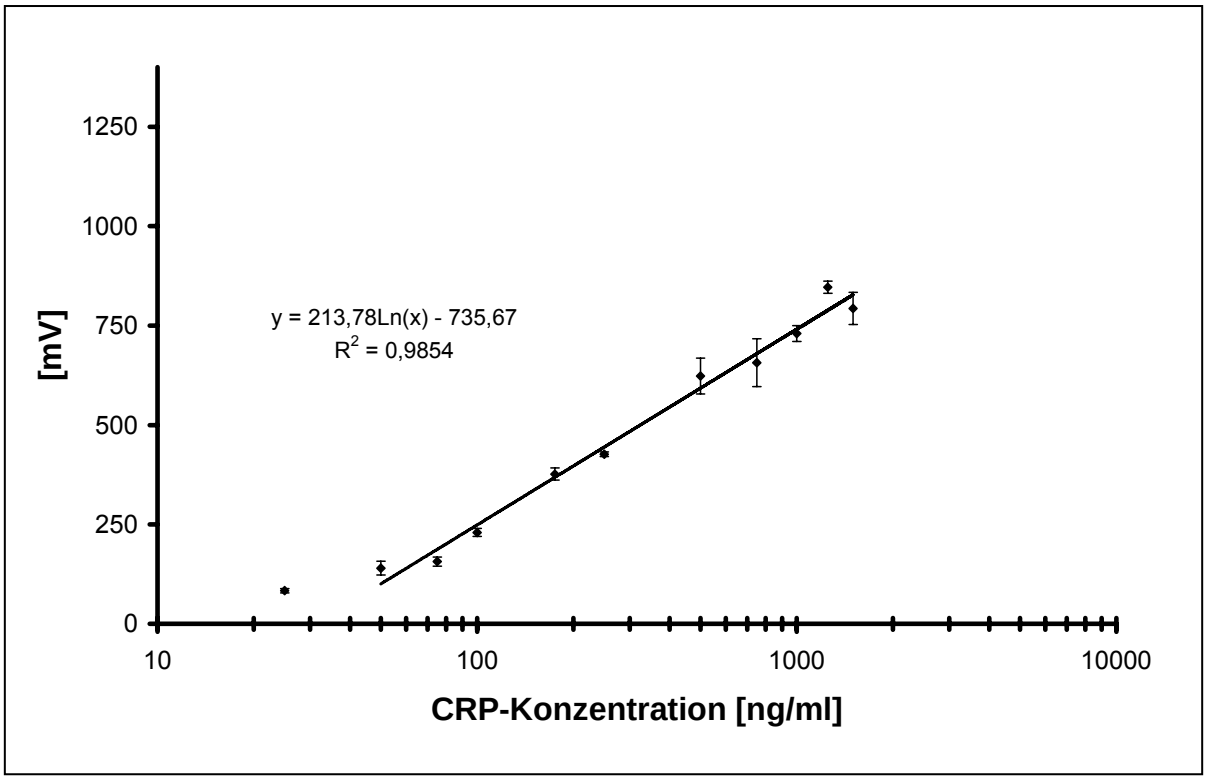


Abbildung 90 Kalibrationsreihe des CRP-Assays in PBS-Puffer mit Seradyn dsMGSA 1,3 Magnetpartikeln. (n=3)

Der logarithmische Messbereich dieser Kalibrationsreihe beträgt 50-1500 ng CRP pro ml. Die Linearität der Ausgleichsgerade ist mit 0,9854 relativ gut. Die maximale Signalhöhe ist mit max. 800 mV akzeptabel, insbesondere unter Berücksichtigung der niedrigen Standardabweichungen der Einzelwerte.

Zur Bestimmung der Standardabweichung des Systems wurde ein Intra-Assay durchgeführt. Hierzu wurden vier verschiedene CRP-Probenkonzentrationen von 0 ng/ml (Blindwert), 50 ng/ml, 500 ng/ml und 1250 ng/ml jeweils 12-mal bestimmt. Tabelle 23 zeigt die Ergebnisse des Intra-Assays.

Tabelle 23 Bestimmung der Standardabweichung des CRP-Detektionssystems.

Konzentration CRP [ng/ml]	Standardabweichung [%]
0 ng/ml (Blindwert)	4,7 %
50 ng/ml	4,1 %
500 ng/ml	3,0 %
1250 ng/ml	3,7 %
Gesamt	**3,9 %**

3.6 Yersinia pestis-Assay mit magnetischer Detektion

Zur Testung der Messbarkeit von anderen Analyten wurde die Detektierbarkeit von Mikroorganismen untersucht. Als Erreger der Pest ist *Yersinia pestis* vielleicht das prägende Bakterium des Mittelalters. Entgegen landläufiger Meinung ist die Krankheit Pest und damit *Y. pestis* aber nicht verschwunden, sondern tritt in Ländern der Dritten Welt immer wieder auf. Insbesondere Madagaskar ist ein Hotspot der Pesterkrankungen der Neuzeit. Da sich eine Infektion mit *Y. pestis* bereits vor Ausbildung einer Lungen- oder Beulenpest erfolgreich mit gängigen Antibiotika bekämpfen lässt, sollte ein sensitives Testsystem zur Frühdiagnostik von *Y. pestis*-Bakterien entwickelt werden. Da *Y. pestis* auch als potentielle Biowaffe eingesetzt werden kann, sollte auch diese Form der Anwendung detektiert werden können.

Nach den positiven Vorgaben des CRP-Assays aus Kap. 3.4 wurde die Entwicklung eines Detektionssystems mit Magnetic Beads im Sandwich-Verfahren getestet.
Aufgrund der Infektionsgefahr und potentiell letalen Wirkung von *Y. pestis* konnte nicht mit nativen Bakterien gearbeitet werden. Als ungefährliches, detektierbares Element von *Y. pestis* wurde daher das F1-Zellmembranprotein ausgewählt. Dieses Zellmembranprotein ist in allen bekannten nativen Zelllinien von *Y. pestis* vorhanden und wird sowohl in wachsenden Zellen als auch in Überdauerungsformen präsentiert. Diese Eigenschaft war wichtig, da bei einem Einsatz von *Y. pestis* als Biowaffe keine empfindlichen wachsenden Zellen eingesetzt werden, sondern die Bakterien in ihrer Überdauerungsform.
Dieses YPF1-Protein kann aus wachsenden Kulturen von *Y. pestis* extrahiert werden und ist nach einer Aufreinigung nicht mehr pathogen. Das erhaltene YPF1-Protein wurde als Antigen für die Entwicklung des Testsystems eingesetzt und von der Firma SENOVA (Jena) bezogen.
Ein Antikörper gegen dieses *Y. pestis* F1-Protein (YPF1) wurde von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF, Braunschweig), einem Projekt-Kooperationspartner, unter der Bezeichnung anti-YP bereitgestellt. Hierbei handelte es sich um einen monoklonaler IgG-Antikörper.

Da für das Testsystem nur ein Antikörper zur Verfügung stand, musste im Unterschied zur CRP-Diagnostik mit einem homologen Sandwich gearbeitet werden. Bei monoklonalen Antikörpern können hier Probleme entstehen, da das detektierte Epitop des Antigens durch

den ersten gebundenen Antikörper blockiert wird. Da der zweite eingesetzte Antikörper nur an der gleichen Struktur binden kann, ist die Anwendung eines homologen Sandwich-Prinzips oft problembehaftet. Dieses Problem konnte in diesem Fall aber vernachlässigt werden, da das YPF1-Protein in der Zellmembran und nach Extraktion in Lösung immer in Clustern vorkommt, d. h. Strukturen von 5-7 Proteineinheiten sind zusammengelagert. Dadurch wird es möglich, mit einem homologen Sandwich-Prinzip zu arbeiten, da das zu detektierende Epitop des Antigens auch 5-7-mal pro Cluster vorkommt.

Zur Etablierung eines homologen Sandwich-Messprinzips auf ABICAP®-Säulen mit magnetischer Detektion wurde der anti-YP Antikörper dementsprechend als Extraktions- und Detektionsantikörper eingesetzt. In seiner Funktion als Extraktionsantikörper wurde der anti-YP an die Oberfläche des PE-Sinterkörpers immobilisiert. Seine Funktion war die Extraktion des Antigens (YPF1) aus der Probe und die Präsentation desselben für eine Markierung mit Magnetic Beads. Die Markierung erfolgte mit dem Markierungsantikörper anti-YP_B, der zu diesem Zweck über eine Biotin-Funktion an die Magnetic Beads gekoppelt war. Durch Bindung des anti-YP_B an das präsentierte YPF1-Protein wurden somit Magnetic Beads auf dem PE-Sinterkörper fixiert und konnten dann mit dem Magnet Reader detektiert und quantifiziert werden. Die Biotinylierung des anti-YP Antikörpers erfolgte an freien Amino-Gruppen.

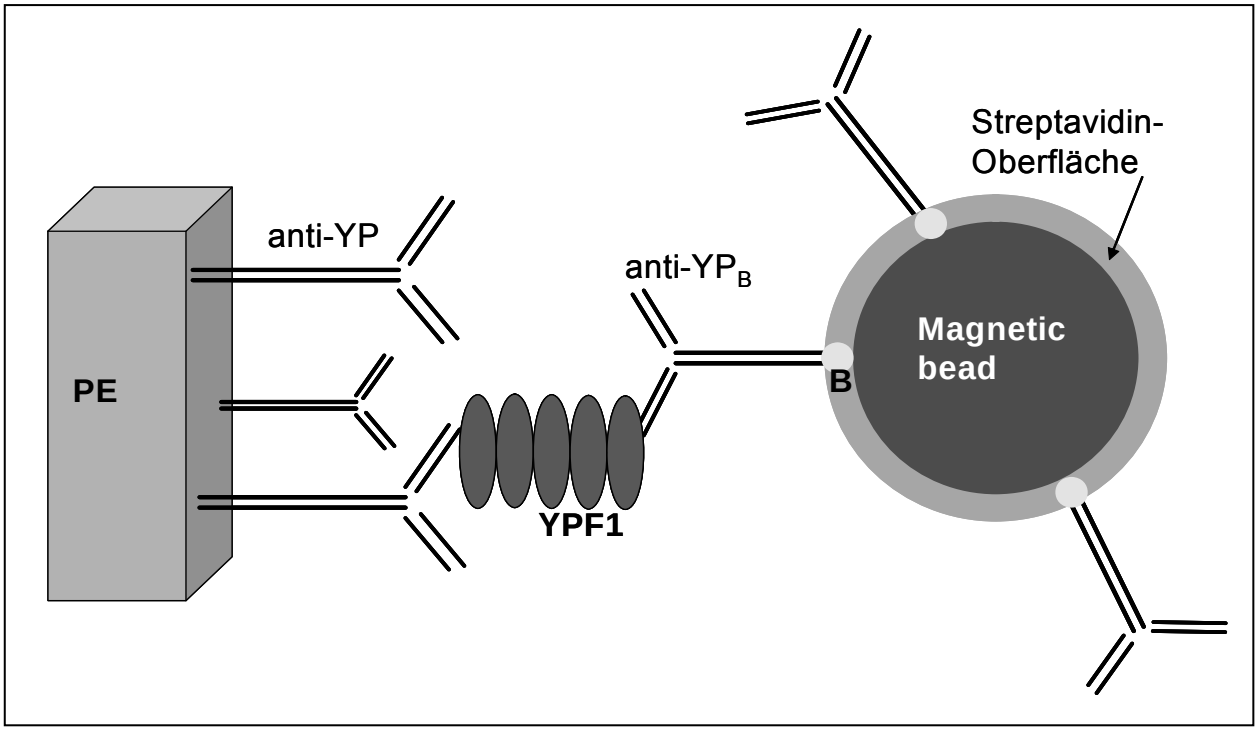


Abbildung 91 **Schematische Darstellung des Detektionsprinzips für *Y. pestis*.** YPF1 = Antigen, anti-YP= Antikörper gegen YPF1, B = Biotinfunktion, PE = Polyethylensinterkörper.

3.6.1 Optimierung des *Y. pestis*-Detektionssystems

In einem ersten Schritt zur Optimierung dieses Testsystems wurden verschiedene Immobilisierungstechniken für den Extraktionsantikörper anti-YP an dem PE-Sinterkörper der ABICAP®-Säule entwickelt und getestet. Hierbei kamen kovalente Immobilisierungsmethoden (GDA, NHS/DCC), Photolinker (FNPA und Sulfo-HSAB) und die bereits im CRP-Assay (Kap. 3.4) erfolgreich eingesetzte adsorptive Beschichtung in Frage.

Nach erfolgter Oberflächenmodifikation der PE-Sinterkörper wurden immer 10 µg Antikörper pro PE-Sinterkörper zur Immobilisierung eingesetzt. Die erfolgreiche Immobilisierung und die Ausbeute an gebundenem und aktivem anti-YP Antikörper wurden unter Durchführung des *Y. pestis*-Assay getestet. In diesem Stadium wurden hierfür 10 µg anti-YP_B pro ABICAP®-Säule an Detektionsantikörper mit filtrierten und blockierten Magnetic Beads Typ SAV1 (NCO) verwendet. Das Antigen als Probe wurde in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 verdünnt; dieser Puffer wurde ebenfalls als Messpuffer für die Magnetic Beads und zum Spülen genutzt. Die Auswertung der Messwerte erfolgte nach Abzug der Blindwerte für jede Immobilisierungsmethode. Für jede Immobilisierungstechnik wurden 3 verschiedene Antigenkonzentrationen jeweils doppelt vermessen. Dargestellt ist der Mittelwert beider Messungen. Es wurde die sequentielle Messmethode verwendet.

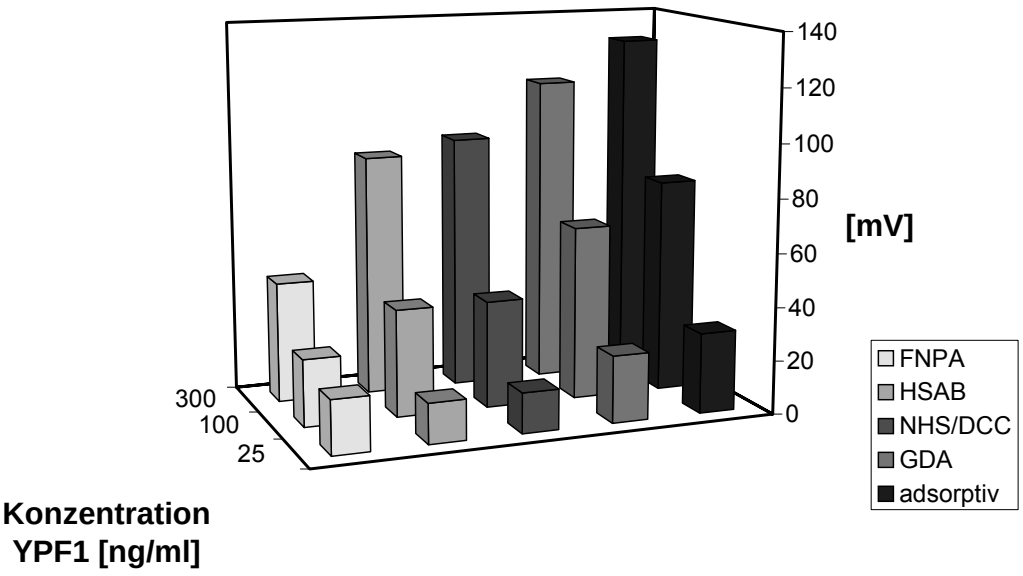


Abbildung 92 Vergleich verschiedener Immobilisierungstechniken für den Extraktionsantikörper anti YP auf Polyethylen. (n=2)

Die Ergebnisse aus Abb. 92 zeigen einen klaren Immobilisierungsnachteil der Photolinker. FNPA bindet anscheinend nicht ausreichende Mengen an Antikörper, was sich in sehr kleinen Messwerten der hohen Antigenkonzentrationen bemerkbar macht. Die Immobilisierungsausbeute des Photolinkers Sulfo-HSAB ist deutlich besser als FNPA, vergleichbar mit der Immobiliserungsausbeute der NHS/DCC-Methode. Die Kopplung über Glutardialdehyd (GDA) an aminofunktionalisierte Oberflächen ist hier die effektivste kovalente Kopplungsmethode. Aufgrund der einfacheren Technik und trotzdem höheren Immobilisierungsausbeute stellt sich die adsorptive Technik wieder als beste Methode dar.

Weiterhin wurde eine Optimierung der optimalen Antikörperkonzentrationen des homologen Sandwich-Prinzips durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen des anti-YP Antikörpers jeweils als Extraktionsantikörper und als anti-YP_B Detektionsantikörper getestet. Es wurde die normale Assaydurchführung im sequentiellen Verfahren angewendet. Bei der Konzentrationsvariation eines Sandwich-Partners wurde die Konzentration des anderen Antikörpers immer konstant gehalten. Abbildung 93 stellt die Ergebnisse der Konzentrationsvariation des Extraktionsantikörpers graphisch dar.

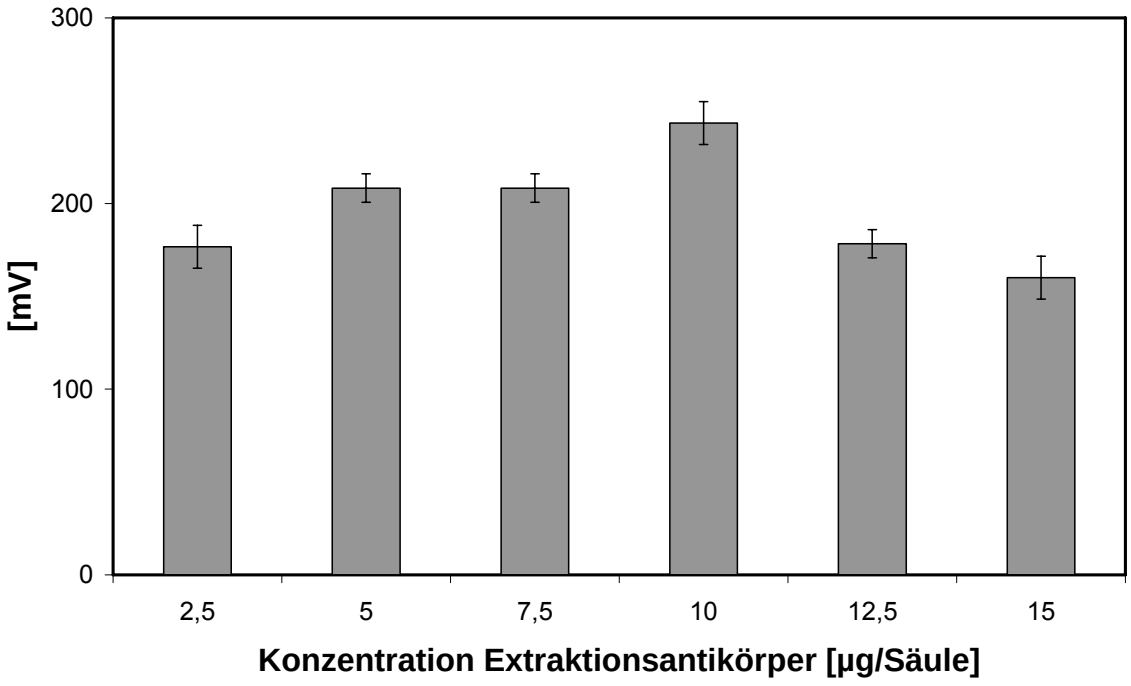


Abbildung 93 Optimierung der Extraktionsantikörperkonzentration des Y. pestis-Assays. (n=3)

Die Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-YP wurde variiert. Die Konzentration des biotinylierten Detektionsantikörpers anti-YPB war konstant 10 µg/Säule. Die Konzentration des Antigens YPF1 betrug 500 ng/ml bei einem Probenvolumen von 500 µl. Eine Konzentration von 10 µg anti-YP pro ABICAP®-Säule mit adsorptiver Beschichtung war hier die optimale Konzentration. Analog zu der Variation der Extraktions-antikörperkonzentration wurde die optimale Konzentration des Detektionanatikörpers anti-YP_B bestimmt.

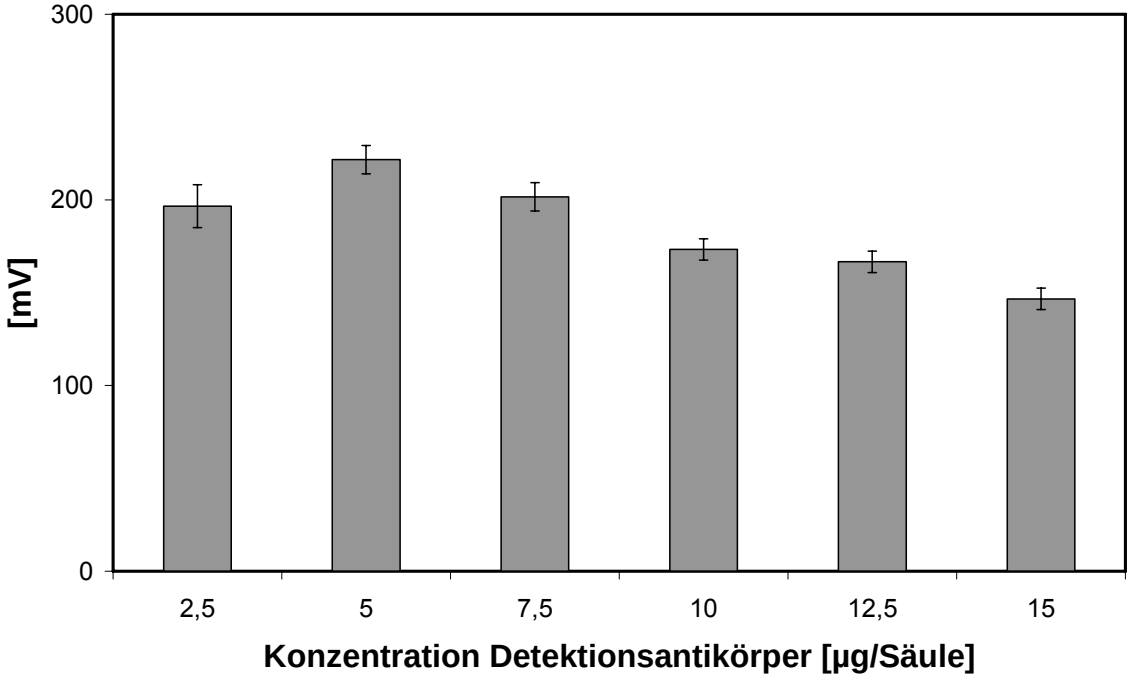


Abbildung 94 Optimierung der Detektionsantikörperkonzentration. (n=3)

Hier wurde die Konzentration des biotinylierten Detektionsantikörpers anti-YPB variiert. Die Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-YP war konstant 10 µg/Säule. Die Konzentration des Antigens FT-LPS betrug 500 ng/ml (Probenvolumen 500 µl).

Als Ergebnis dieses Tests wurde eine optimale Konzentration des Detektionsantikörpers anti-YP_B mit einer Konzentration von 5 µg pro ABICAP®-Säule ermittelt. Zusammen mit der ermittelten Konzentration von 10 µg pro Säule Extraktionsantikörper sollte ein möglichst hohes Messsignal erreicht werden können.

Als Messpuffer wird der Puffer bezeichnet, in dem die Probe und die Magnetic Beads verdünnt werden. Außerdem werden die ABICAP®-Säulen vor Beginn der Messung mit diesem Puffer konditioniert und nach jeder Zugabe wird die Säule mit diesem Puffer gespült. Da bereits sehr gute Ergebnisse aus Kap. 3.4 mit 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 vorlagen, wurde dieser Messpuffer übernommen.

Als optimale Parameter für die Durchführung des *Y. pestis*-Assays wurde demnach eine adsoptive Beschichtung des PE-Sinterkörpers mit 10 µg anti-YP Extraktionsantikörper pro ABICAP®-Säule bestimmt. Die optimale Konzentration des Detektionsantikörpers anti-YP_B zur Kopplung an die filtrierten und blockierten Magnetic Beads Typ SAV1 (NCO) betrug 5 µg pro ABICAP®-Säule. Die Durchführung des Asssays erfolgte in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3.

3.6.2 Detektion des *Y. pestis*-Antigens in Puffer

Als Ergebnis der Optimierungsschritte für diesen Assay konnte eine erste Kalibrationsreihe zur Charakterisierung des Systems in Messpuffer bestimmt werden.
Die Analytik in Messpuffer erfüllt hierbei noch eine zweite Anforderung, da der typische Einsatz von *Y. pestis* als Biowaffe in Form von Aerosol oder Pulver erfolgt. Sowohl Aerosole als auch Pulver können in Messpuffer aufgenommen und dann als Probe vermessen werden. Die Kalibration in Messpuffer dient hier also nicht nur einer Charakteriserung des Systems, sondern stellt eine reale Kalibration dar.

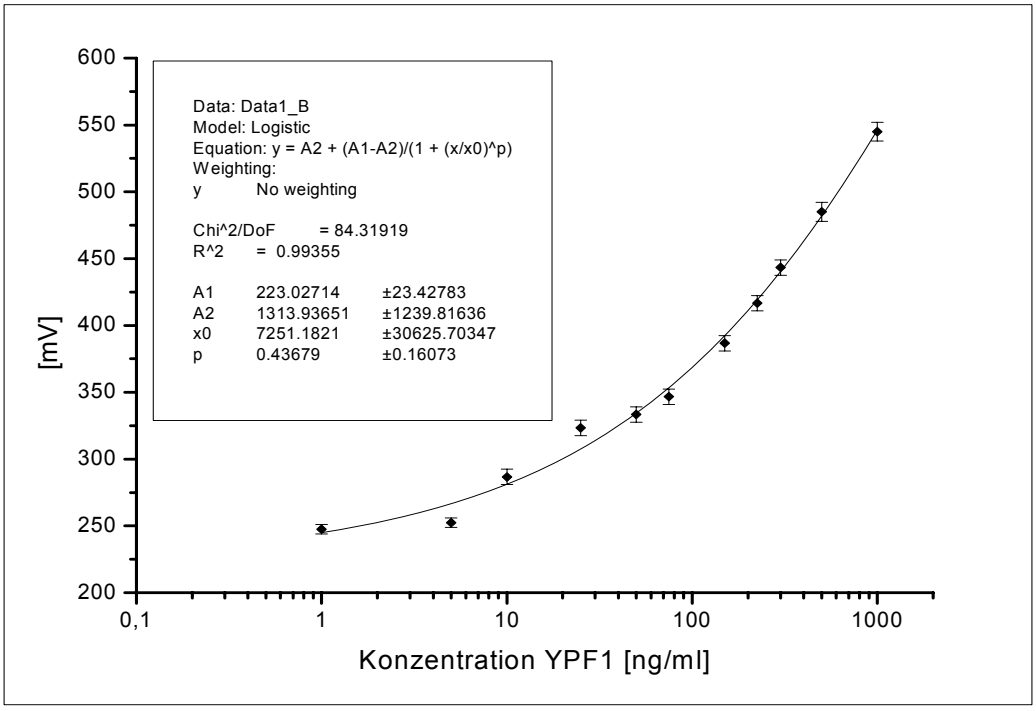


Abbildung 95 Kalibrationsreihe der Detektion von *Y. pestis* F1 in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3.

Bei der Messung wurden die in Kap. 3.6.1 optimierten Parameter eingehalten, es wurde die sequentielle Methode verwendet.

Die Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-YP betrug 10 µg pro Säule bei adsorptiver Immobilisierung, die Konzentration des Detektionsantikörpers anti-YPB betrug 5 µg pro Säule. Das Probenvolumen betrug 500 µl. Der Blindwert (0 ng YPF1/ml) betrug 250 mV. Der Messwert für 1 ng/ml YPF1 lag unter dem Blindwert. Die Analyse dieser Kalibrationsreihe ergab folgenden linearen Messbereich.

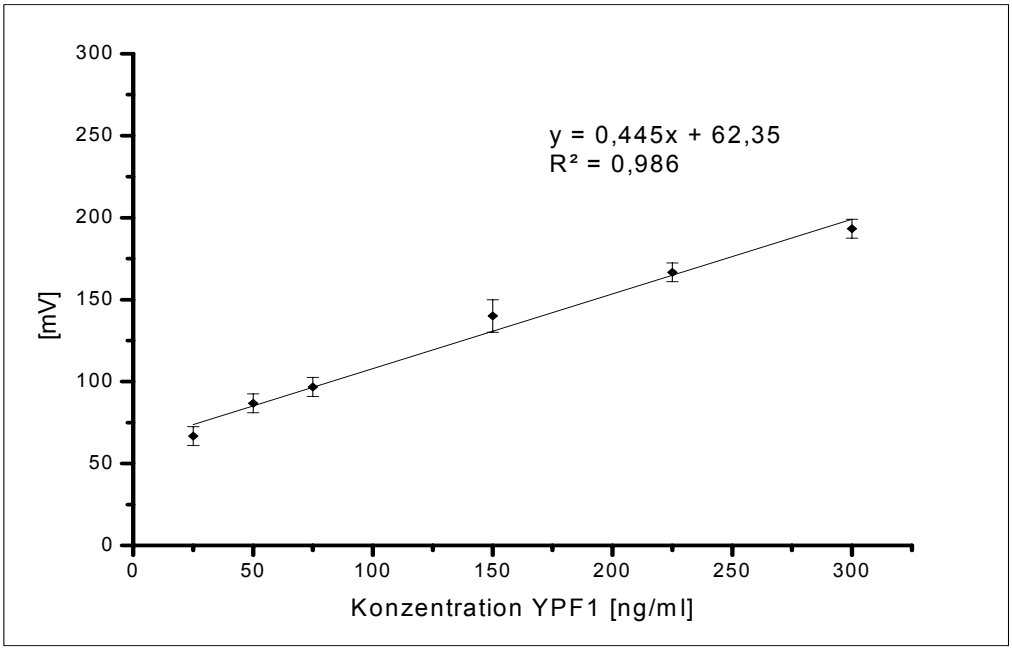


Abbildung 96 Linearer Messbereich der Kalibrationsreihe der Detektion von *Y. pestis* F1 in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3.

Der lineare Messbereich dieses Assays reicht von 25-300 ng YPF1 pro ml bei einem Probenvolumen von 500 µl. Die Linearität der Ausgleichsgerade betrug 0,986.

Zur Ermittlung der Standardabweichung und der Verlässlichkeit des *Y. pestis*-Assays wurde ein Intra-Assay durchgeführt. Die bestimmten Konzentrationen waren 0 ng/ml (Blindwert), 25 ng/ml, 100 ng/ml und 300 ng/ml bei jeweils 500 µl Probenvolumen. Jede Konzentration wurde 12-mal getestet. Zur Ermittlung der Standardabweichungen wurden die Netto-Signale nach Abzug des Blindwert-Mittelwertes verwendet.

Tabelle 24 Intra-Assay des *Y.pestis*-Assays in Puffer.

Konzentration YPF1 [ng/ml]	Standardabweichung [%]
0 ng/ml	8,2 %
25 ng/ml	6,9 %
100 ng/ml	3,2 %
300 ng/ml	5,3 %
Gesamt	**6,1 %**

Man erkennt wiederum eine deutlich höhere Standardabweichung bei den niedrigen Probenkonzentrationen. Insgesamt ist die Standardabweichung mit 6,1 % gut.

3.6.3 Detektion von *Y. pestis* in humanem Blutserum

Die Detektion eines pathogenen Bakteriums für die humane und tierische Diagnostik erfordert eine Charakterisierung des Detektionsystems in einer typischen Probenmatrix. Zur Simulation einer humanen Probe, z. B. aus einem infiziertem Bulbus, wurde die Detektion des *Y. pestis* YPF1-Proteins in humanem Blutserum getestet. Das verwendete Blutserum war kommerziell erhältlich und aus Blutkonserven eines Spenderpools gewonnen worden. Eine Kontamination des Blutserums mit *Y. petis* konnte ausgeschlossen werden, zusätzlich durchgeführte Tests waren negativ. Die Variation einer Probenkonzentration wurde durch Dotieren des Blutserums mit dem YPF1-Protein erreicht. Die Messung erfolgte nach der sequentiellen Methode unter optimierten Bedingungen.

Zur Charakterisierung des Detektionssystems in dieser Probenmatrix wurde eine Kalibrationsreihe aufgenommen. Die Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-YP betrug 10 µg pro Säule bei adsorptiver Immobilisierung; die Konzentration des Detektionsantikörpers anti-YPB betrug 5 µg pro Säule. Das Probenvolumen betrug 500 µl. Der Blindwert (0 ng YPF1/ml) betrug 235 mV.

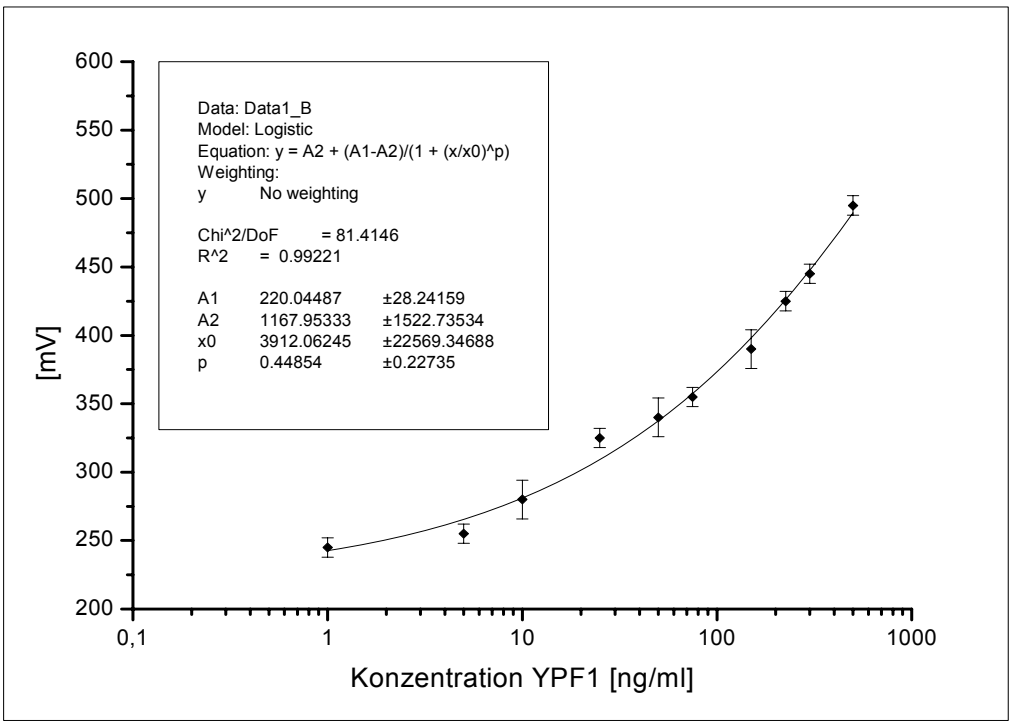


Abbildung 97 Kalibrationsreihe der Detektion von *Y. pestis* F1 in humanem Blutserum.

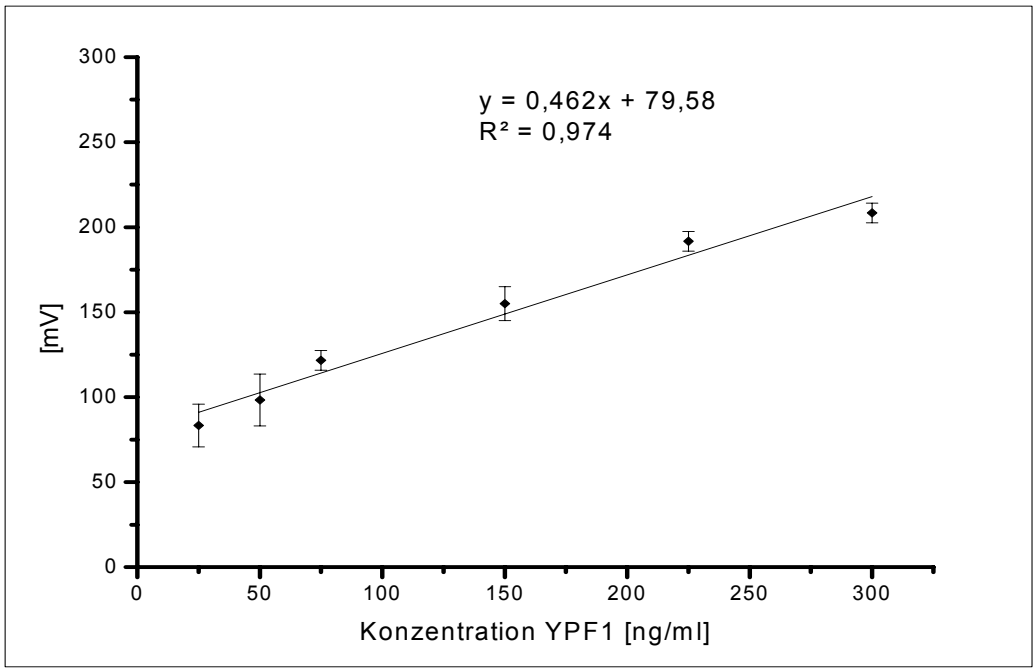


Abbildung 98 Linearer Messbereich der Kalibrationsreihe der Detektion von *Y. pestis* F1 in humanem Blutserum.

Die Kalibration dieses Assays in Blutserum ergab einen linearen Detektionsbereich von 25 - 225 ng YPF1 pro ml. Die Linearität der Ausgleichsgeraden betrug 0,974. Die Standardabweichungen und das R^2 der Ausgleichsgerade sind schlechter als in Kap. 3.6.2, dies kann ein Effekt der komplexen Probenmatrix sein.

Zur genauen Bestimmung der Standardabweichungen und Verlässlichkeit dieser Detektion in humanem Blutserum wurde ebenfalls ein Intra-Assay durchgeführt. Die Konzentrationen 0 ng/ml (Blindwert), 25 ng/ml, 100 ng/ml und 300 ng/ml wurden jeweils 12-mal getestet.

Tabelle 25 Intra-Assay des *Y. pestis*-Assays in humanem Blutserum.

Konzentration YPF1 [ng/ml]	Standardabweichung [%]
0 ng/ml	9,9 %
25 ng/ml	8,4 %
100 ng/ml	6,1 %
300 ng/ml	5,8 %
Gesamt	**7,5 %**

Man erkennt deutlich höhere Standardabweichungen im Vergleich zur Detektion in Puffer. Auch bei dieser Messung sind die Standardabweichungen der niedrigen Probenkonzentrationen deutlich erhöht. Insgesamt ist die durchschnittliche Standardabweichung von 7,5 % akzeptabel.

3.6.4 Detektion von *Y. pestis* in Kaninchenserum mit magnetischer Extraktion

Zusätzlich zur Diagnostik in humanem Blutserum macht auch eine Charakterisierung des Detektionssystems in Nagerserum Sinn. Insbesondere bei der Evaluation des *Y. pestis*-Zwischenwirtes Wanderratte (*Rattus norvegicus*) ist eine schnelle und verlässliche Analyse notwendig. Da Rattenserum nicht kommerziell erhältlich ist, wurde das leicht verfügbare Kaninchenserum verwendet. Es ist in seiner Zusammensetzung zu Rattenserum vergleichbar. Das verwendete Serum war laut Hersteller garantiert frei von bakteriellen Kontaminationen, ein Test auf YPF1 war negativ.

Um eine schnellere Diagnosemöglichkeit zu testen, wurde für diese Kalibrationsreihe die magnetische Extraktion eingesetzt. Zur Extraktion wurde der filtrierte Detektionsantikörper anti-YP_B direkt mit dotierter YPF1-Probe und Magnetic Beads in das Kaninchenserum gegeben. Die Konzentrationen für eine Säule bezogen sich hier auf jeweils 500 µl Serum. Jede getestete Konzentration wurde für 1 Stunde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (2 ml) schüttelnd inkubiert und anschließend magnetisch extrahiert. Die extrahierten Magnetic Beads wurden anschließend in 500 µl Caseinpuffer (1:10 v/v) resuspendiert und über die Säule gegeben. Hierbei wurden die Konzentrationen der vorherigen Kalibrationsreihen verwendet. Abb. 99 zeigt die bestimmte Kalibrationsreihe.

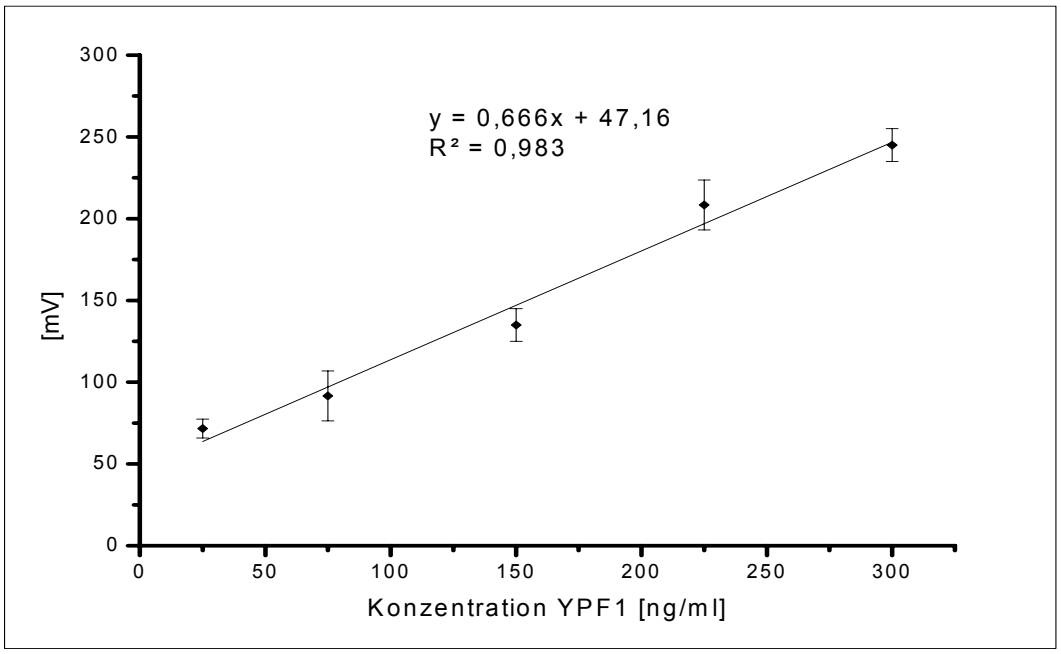


Abbildung 99 **Kalibrationsreihe der Detektion von *Y. pestis* F1 in Kaninchenserum mit magnetischer Extraktion.**

Die Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-YP betrug 10 µg pro Säule bei adsorptiver Immobilisierung, die Konzentration des Detektionsantikörpers anti-YPB betrug 5 µg pro Säulenequivalent an Probe. Das Probenvolumen betrug 500 µl. Die Kalibrationsreihe des *Y. pestis*-Assays in Kaninchenserum mit magnetischer Extraktion brachte ebenfalls einen linearen Detektionsbereich von 25-300 ng YPF1 pro ml. Die Linearität der Ausgleichsgerade ist im Vergleich mit anderen Ausgleichsgeraden dieses Assays mit 0,983 vergleichbar. Die deutlich höhere Steigung der Ausgleichsgeraden von 0,666 im Vergleich zur sequentiellen Detektion ist ein typischer Effekt der magnetischen Extraktion, auf den an späterer Stelle noch einzugehen sein wird.

Zur genaueren Charakterisierung der Standardabweichung und Verlässlichkeit des Detektionssystems wurde ein Intra-Assay durchgeführt. Hierbei wurden die Konzentrationen 0 ng/ml (Blindwert), 25 ng/ml, 100 ng/ml und 300 ng/ml jeweils 12-mal vermessen.

Tabelle 26 Intra-Assay des *Y. pestis*-Assays in Kaninchenserum mit magnetischer Extraktion.

Konzentration YPF1 [ng/ml]	Standardabweichung [%]
0 ng/ml	9,6 %
25 ng/ml	5,1 %
100 ng/ml	5,3 %
300 ng/ml	5,7 %
Gesamt	**6,4 %**

Die Standardabweichung des Blindwertes ist wieder deutlich erhöht. Insgesamt sind die durchschnittlichen Standardabweichungen aller drei Konzentrationen gut, insbesondere für das Verfahren der magnetischen Extraktion.

3.7 Magnetische Detektion von Francisella tularensis

Ein weiterer Vertreter der pathogen Mikroorganismen im Kontext der Biowaffen ist neben *Y. pestis* das Bakterium *Francisella tularensis*. Die Entwicklung eines Assays zur Detektion von *Francisella tularensis* basierte wie die vorhergehenden CRP- und *Yersinia*-Assays auf einem Sandwich-Prinzip. *F. tularensis* konnte als Erreger der Hasenpest und mit seinem Gefährdungspotential für Menschen, auch als Biowaffe, nicht als lebender Organismus bearbeitet werden. Die Einstufung als fakultativ letaler Organismus mit humanen Letalitätsraten von bis zu 10 % unter Antibiotikagabe machte eine Fokussierung des Diagnosesystems auf ungefährliche Einzelbestandteile dieses Bakteriums nowtendig. Als relativ ungefährliches, aber immer vorhandenes Element von *F. tularensis* wurde ein Lipopolysaccharid (FT-LPS) ermittelt, das bei humanem Kontakt nur zu einer Hypersensibilisierung des Immunsystems führen kann. Da für das FT-LPS auch ein passender Antikörper (anti-FT) erhältlich ist, wurde ein Assay mit magnetischer Detektion auf dieses in allen *F. tularensis*-Substämmen vorkommende Lipopolysaccharid entwickelt.

Die Etablierung eines Sandwich-Prinzips zur Detektion des FT-LPS machte den Einsatz eines Fänger- bzw. Extraktionsantikörpers in der ABICAP®-Säule und eines Markierungsantikörpers in Verbindung mit den Magnetic Beads notwendig. Da auch bei

diesem Assay nur ein Antikörpertyp zur Verfügung stand, wurde also ein homologes Sandwich getestet.

Aufgrund bereits sehr guter Erfahrungen aus vorherigen Kapiteln wurde der anti-FT Extraktionsantikörper gegen das FT-LPS adsorptiv auf dem PE-Sinterkörper immobilisiert. Der Detektionsantikörper war ebenfalls der anti-FT, zur notwendigen Kopplung an die Magnetic Beads wurde aber eine Biotinylierung an Amino-Gruppen durchgeführt.

Die Entwicklung vorheriger Assays hat bereits die Vorteile verschiedener Entwicklungsstufen gezeigt, daher wurden hier direkt filtrierte Beads und als Messpuffer PBS pH 7,3 (0,15 M) eingesetzt. Abbildung 100 zeigt eine schematische Darstellung des Detektionsprinzips.

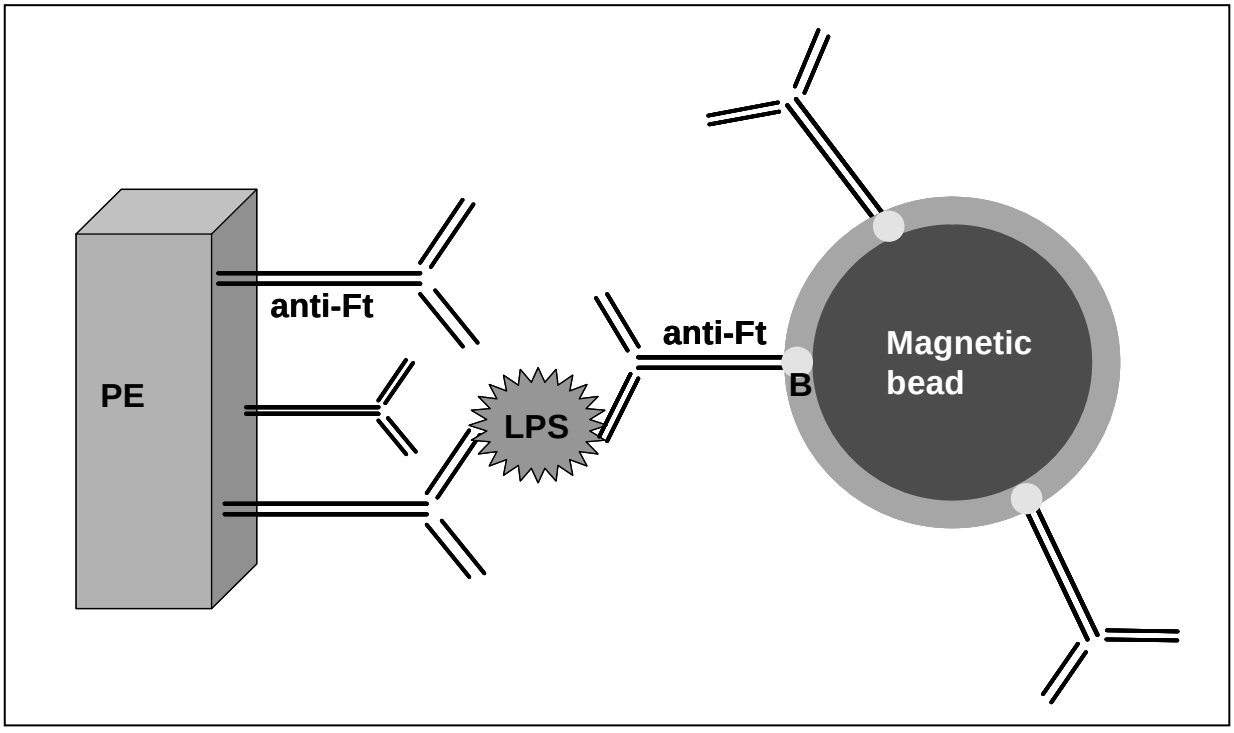


Abbildung 100 Schematische Darstellung des Detektionsprinzip des *F. tularensis*-Assay.

Schematische Darstellung des Detektionsprinzip des *F. tularensis*-Assay.
PE = Polyethylensinterkörper, anti-FT = Antikörper gerichtet gegen F. tularensis Lipopolysaccharid, B = Biotinylierung an Antikörper.

3.7.1 Optimierung des Extraktions- und Detektionsantikörpers

Zur Optimierung des Sandwich-Prinzips wurden verschiedene Konzentrationen des anti-FT Antikörpers jeweils als Extraktions- und Detektionsantikörper getestet. Hierzu wurde die normale Assaydurchführung im sequentiellen Verfahren angewendet. Bei der

Konzentrationsvariation eines Sandwich-Partners wurde die Konzentration des anderen Antikörpers immer konstant gehalten. Abbildung 101 zeigt die Konzentrationsvariation des Extraktionsantikörpers.

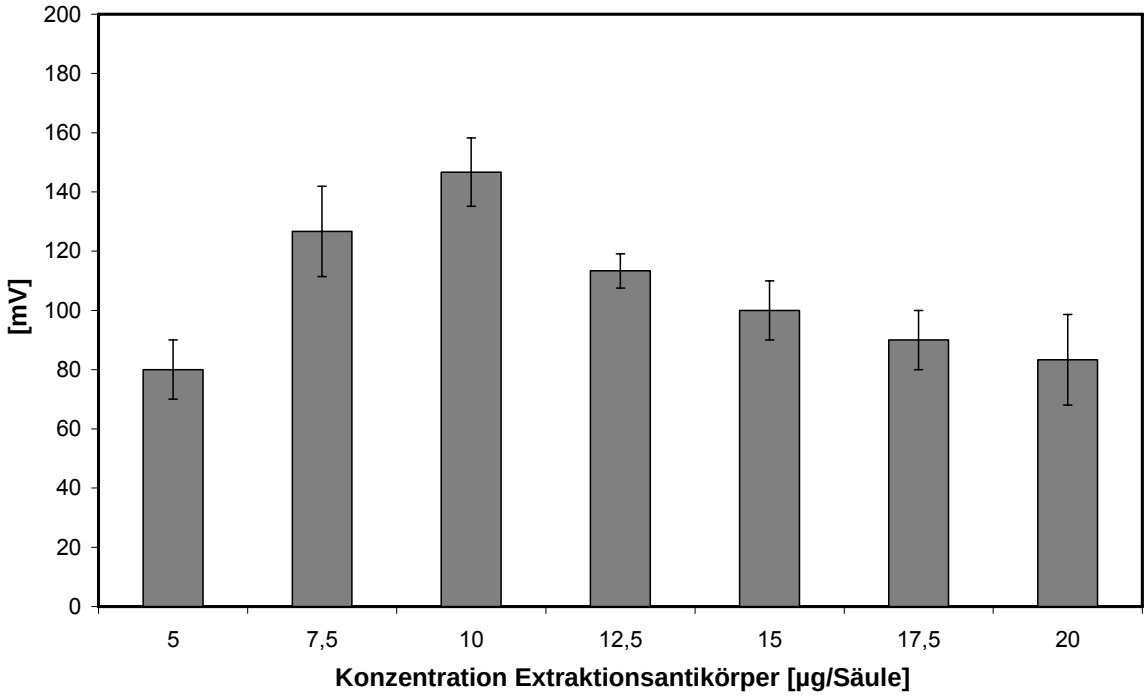


Abbildung 101 Optimierung der Extraktionsantikörperkonzentration. (n=3)

Die Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-FT wurde variiert. Die Konzentration des biotinylierten Detektionsantikörpers anti-FTB war konstant 10 µg/Säule. Die Konzentration des Antigens FT-LPS entsprach 5 x 10^3 cfu/ml.

Analog hierzu erfolgte die Optimierung der notwendigen Konzentration des biotinylierten Detektionsantikörpers anti-FT_B. Auch für dieses System wurde die Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-FT konstant bei seinem bereits ermittelten Optimum von 10 µg/Säule gehalten. Als Antigen kam FT-LPS zum Einsatz, das durch Extraktion der Lipopolysaccharid-Fraktion aus einer lysierten *F. tularensis*-Kultur gewonnen wurde. Die Konzentration des FT-LPS betrug für diese Optimierungsversuche 5 x 10^3 cfu pro ml, wobei 500 µl Probe (FT-LPS verdünnt in Messpuffer) pro Säule eingesetzt wurden.

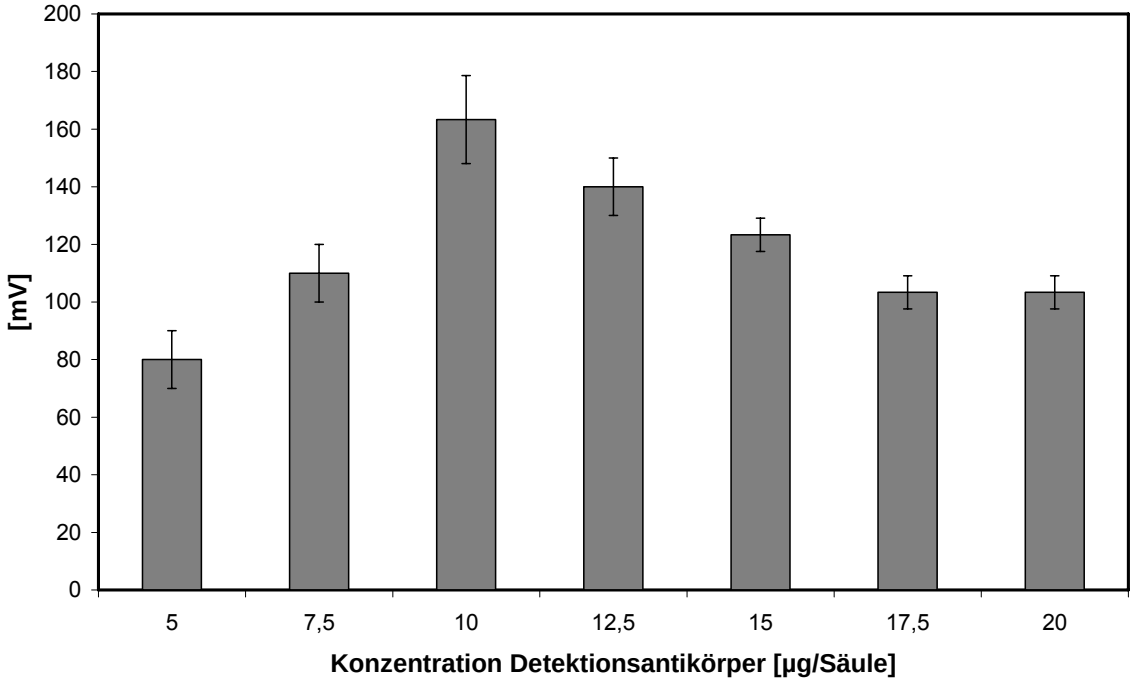


Abbildung 102 Optimierung der Detektionsantikörperkonzentration. (n=3)

Die Konzentration des biotinylierten Detektionsantikörpers anti-FTB wurde variiert. Die Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-FT war konstant 10 µg/Säule. Die Konzentration des Antigens FT-LPS entsprach 5 x 10^3 cfu/ml.

Als Ergebnis dieses Optimierungsschrittes wurden die Extraktions- und Detektionsantikörper in allen folgenden Versuchen mit einer Konzentration von jeweils 10 µg Antikörper pro Säule eingesetzt. Das heißt, bei der Vorbereitung der Säulen wurden 10 µg Extraktionsantikörper anti-FT pro Säule immobilisiert und außerdem 10 µg biotinylierter Detektionsantikörper anti-FT_B pro Säule der Magnetic Beads-Lösung zugesetzt.

3.7.2 Etablierung und Kalibration in Puffer

Zur Etablierung und Charakterisierung des *F. tularensis*-Assays wurde die Kalibrationsfähigkeit getestet. Hierfür wurde eine Eichreihe des FT-LPS in Messpuffer (0,15 M PBS pH 7,3) angefertigt und im sequentiellen Verfahren mit den in Kap. 3.7.1 optimierten Antikörperkonzentrationen bestimmt. Die Angaben [cfu/ml] bezeichnen eine entsprechende Näherung an den tatsächlichen Ausgangswert der Organismenzahl.

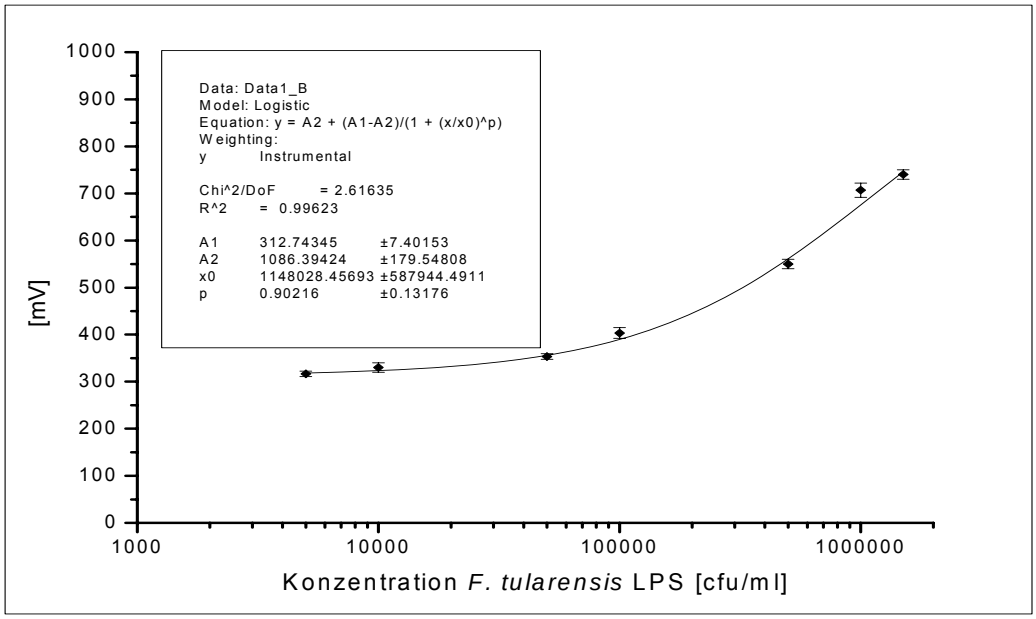


Abbildung 103 Kalibration des *F. tularensis*-Assays in Puffer.

Die Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-FT betrug 10 µg pro Säule, die Konzentration des Detektionsantikörpers anti-FTB betrug ebenfalls 10 µg pro Säule. Das Probenvolumen betrug 500 µl. Der Blindwert (0 cfu/ml) betrug 230 mV. Die Auswertung dieser sigmoiden Kalibrationsreihe ergab folgenden linearen Messbereich.

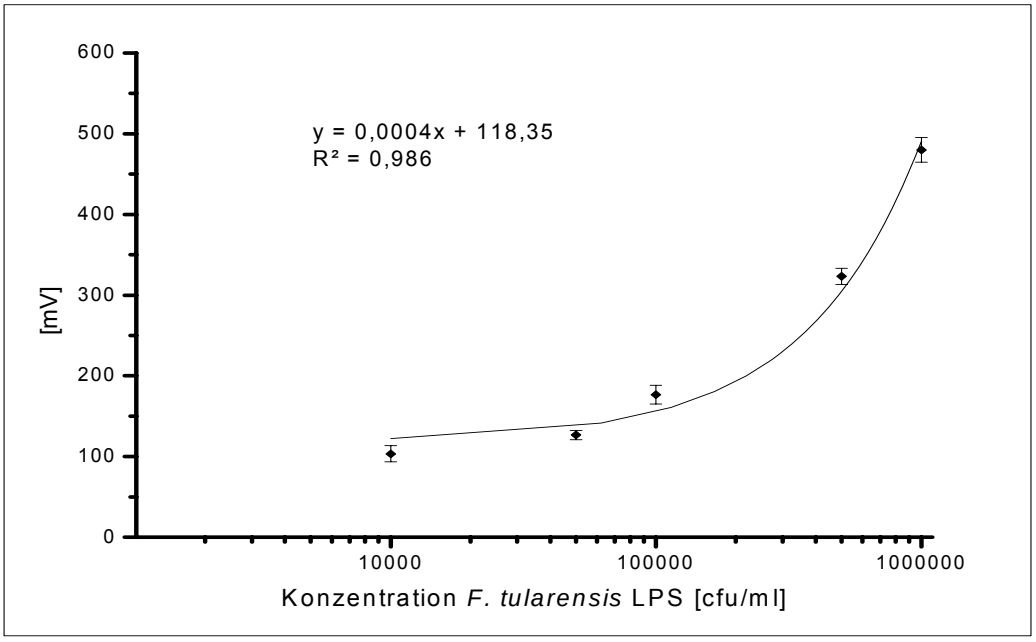


Abbildung 104 Kalibration des *F. tularensis*-Assays in Puffer. Linearer Messbereich.

Die lineare Kalibration dieses Assays ergab einen linearen Messbereich von 10^4 – 10^6 cfu FT-LPS pro ml (Näherung entsprechend der Ausgangszahl der Organismen) mit einer akzeptablen Linearität von 0,986.

Zur Bestimmung der Standardabweichung und Verlässlichkeit des *F. tularensis*-Assays in Puffer wurde ein Intra-Assay durchgeführt. Die getesteten Konzentrationen waren 0 cfu/ml (Blindwert), 10^4 cfu/ml, 10^5 cfu/ml und 10^6 cfu/ml. Jede Konzentration wurde 12-mal getestet. Zur Ermittlung der Standardabweichungen wurden die Netto-Signale nach Abzug des Blindwert-Mittelwertes verwendet.

Tabelle 27 Intra-Assay des *F. tularensis*-Assay in Puffer.

Konzentration FT-LPS [cfu/ml]	Standardabweichung [%]
0 cfu/ml (Blindwert)	7,2 %
10^4 cfu/ml	5,9 %
10^5 cfu/ml	3,9 %
10^6 cfu/ml	5,4 %
Gesamt	**5,6 %**

3.7.3 Etablierung und Kalibration in Kaninchen-Serum

Die Kalibrierung des *F. tularensis*-Assays in Puffer macht nur in wenigen Realanwendungen tatsächlich Sinn. Als Beispiel wäre hier eine Diagnostik mit vorgeschalteter Bakterienkultivierung zu nennen; die bewachsene Kultur könnte abzentrifugiert, in Messpuffer resuspendiert und dann getestet werden. Bei einem Einsatz zur Bestimmung von Biowaffen ist eine Kalibration in Puffer ebenfalls sinnvoll, da solche Bakteriendauerkulturen häufig in getrockneter oder stabilisierter Form aufgefunden werden; diese Proben könnten ebenfalls leicht in Puffer verdünnt zur Messung eingesetzt werden.

Bei der tatsächlichen Labordiagnostik ist aber immer die schnelle Charakterisierung einer organischen Probe notwendig. Dies kann z. B. eine Blutprobe von symptomatischen Nagern oder Menschen sein. Um die Anwendbarkeit des etablierten *F. tularensis*-Assays auch für klinische Proben zeigen zu können, wurde in Kanichen-Blutserum eine

Kalibration und Bestimmung der Assay-Standardabweichung (Intra-Assay) durchgeführt. Als Matrix wurde hier Kaninchen-Blutserum verwendet, da dieses deutlich einfacher zu bekommen und unkomplizierter in der Handhabung als humanes Blutserum ist. Trotzdem ist Kanichen-Blutserum aufgrund seiner sehr ähnlichen Zusammensetzung absolut vergleichbar zu Blutserum humanem Ursprungs. Das erhaltene Kaninchen-Blutserum war getestet auf mikrobielle Kontaminationen und definitiv frei von *Francisella tularensis* LPS.

Für die Kalibration in Kaninchenserum wurden die bereits in Kap. 3.7.1 optimierten Antikörperkonzentrationen eingesetzt. Der Assay wurde sequentiell ausgeführt, das heißt die FT-LPS-Probe wurde in Kaninchenserum verdünnt und dann in die vorbereitete Säule einpipettiert (500 µl pro Säule). Nach 30-minütiger Inkubation wurde mit Messpuffer (0,15 M PBS pH 7,3) gespült und die filtrierte Magnetic Beads-Lösung in Messpuffer mit 10% Caseinpuffer zugegeben (ebenfalls 500 µl pro Säule). Nach weiteren 30 Minuten Inkubation wurde zweimal mit 700 µl Messpuffer gespült und die Probe danach im Magnet Reader vermessen.

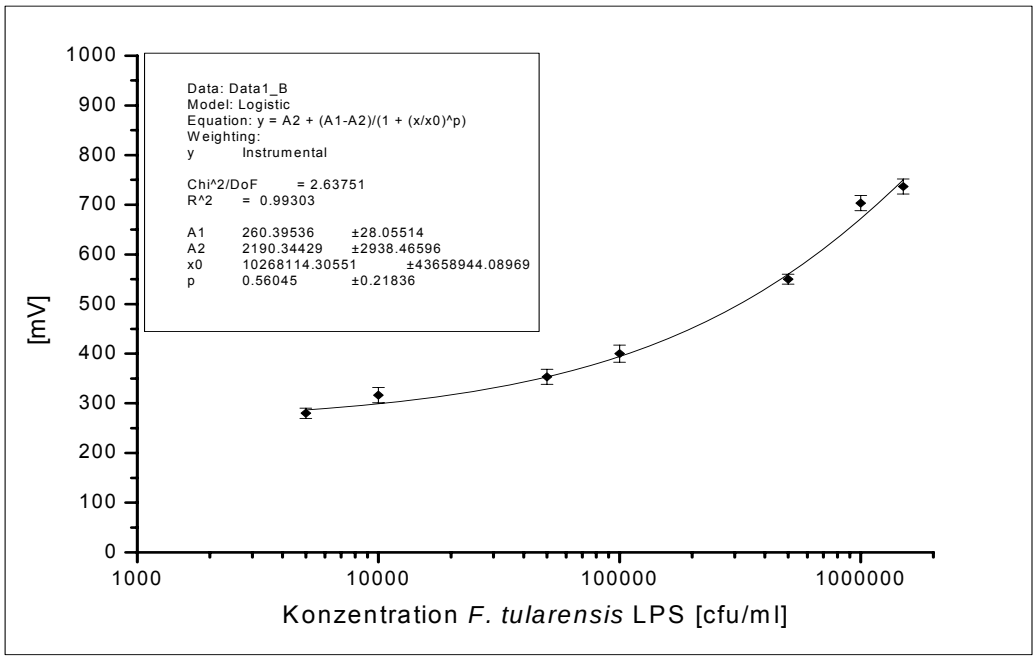


Abbildung 105 Kalibration des *F. tularensis*-Assays in Kaninchenserum.

Die Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-FT betrug 10 µg pro Säule, die Konzentration des Detektionsantikörpers anti-FTB betrug ebenfalls 10 µg pro Säule. Das Probenvolumen betrug 500 µl. Der Blindwert (0 cfu/ml) betrug 235 mV.

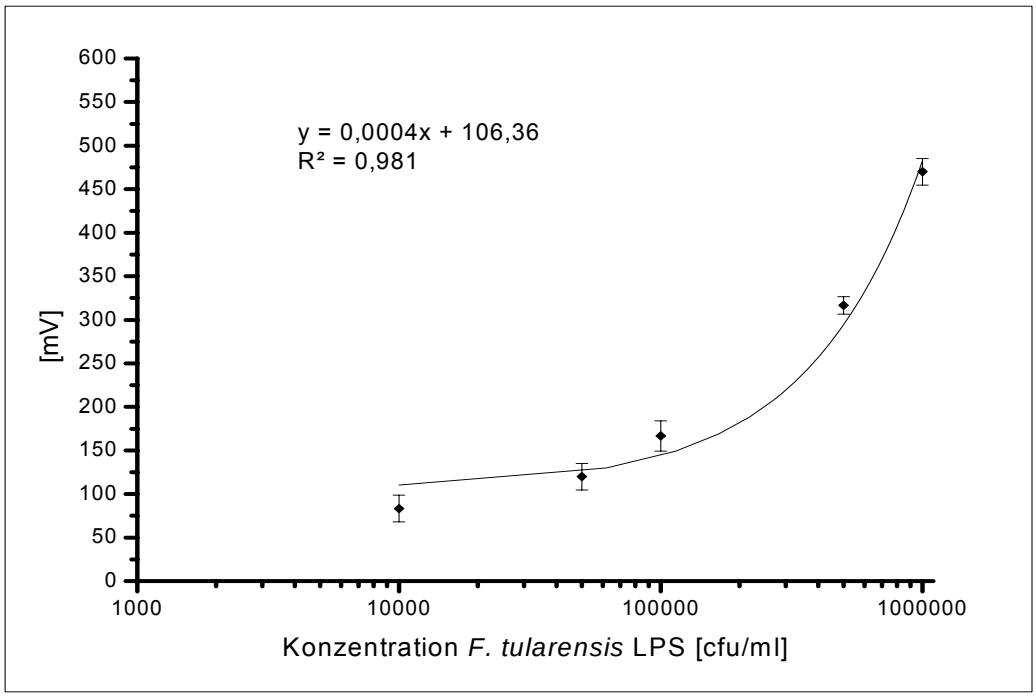


Abbildung 106 Kalibration des *F. tularensis*-Assays in Kaninchenserum. Linearer Messbereich.

Die lineare Kalibration dieses Assays ergab einen linearen Messbereich von 10^4 – 10^6 cfu FT-LPS pro ml mit einer Linearität von 0,981. Diese Werte decken sich sehr gut mit den Ergebnissen der Messungen in Puffer aus Kap. 3.7.1. Die Linearität ist aufgrund höherer Standardabweichungen in Abb. 106 geringfügig schlechter als bei der Kalibration in Puffer (Abb. 104), dies kann aber in der komplexeren Probenmatrix begründet sein.

Zur Bestimmung der Standardabweichung und Verlässlichkeit des *F. tularensis*-Assays in Kaninchenserum wurde auch hier ein Intra-Assay durchgeführt. Die getesteten Konzentrationen waren wiederum 0 cfu/ml (Blindwert), 10^4 cfu/ml, 10^5 cfu/ml und 10^6 cfu/ml. Jede Konzentration wurde 12-mal getestet. Zur Ermittlung der Standardabweichungen wurden die Netto-Signale nach Abzug des Blindwert-Mittelwertes verwendet.

Tabelle 28 Intra-Assay des *F. tularensis*-Assay in Kaninchenserum.

Konzentration FT-LPS [cfu/ml]	Standardabweichung [%]
0 cfu/ml (Blindwert)	6,4 %
10^4 cfu/ml	4,1 %
10^5 cfu/ml	6,1 %
10^6 cfu/ml	5,4 %
Gesamt	**5,5 %**

Auch diese Ergebnisse sind sehr gut vergleichbar zur *F. tularensis*- Detektion in Puffer. Die durchschnittliche Standradabweichung von 5,5 % ist für immunodiagnostische Systeme akzeptabel.

3.7.4 Detektion mit magnetischer Extraktion

Im Vergleich zur sequentiellen Detektion der in Kap. 3.7.1 und 3.7.2 beschriebenen *F. tularensis*-Assays kann eine schnellere Bestimmung der Probe und eine deutlich einfacherere Handhabung durch die kombinierte magnetische Extraktion und Detektion erreicht werden. Hierbei wird die Probe direkt mit dem Detektionsantikörper anti-FT_B und den Magnetic Beads inkubiert und anschließend magnetisch extrahiert. Die extrahierten Magnetic Beads wurden anschließend in Messpuffer (0,15 M PBS pH 7,3) mit 10% Caseinpuffer resuspendiert und in die Chromatographiesäule einpipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Säule zweimal mit Messpuffer gespült und dann vermessen.

Die Inkubation der Proben erfolgte in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (2 ml) mit einem Probenvolumen von 500 µl. Zu dieser Probe wurden 10 µg anti-FT_B Detektionsantikörper und 125 µg Magnetic Beads gegeben. Abbildung 107 zeigt die Kalibration dieses Systems in Messpuffer.

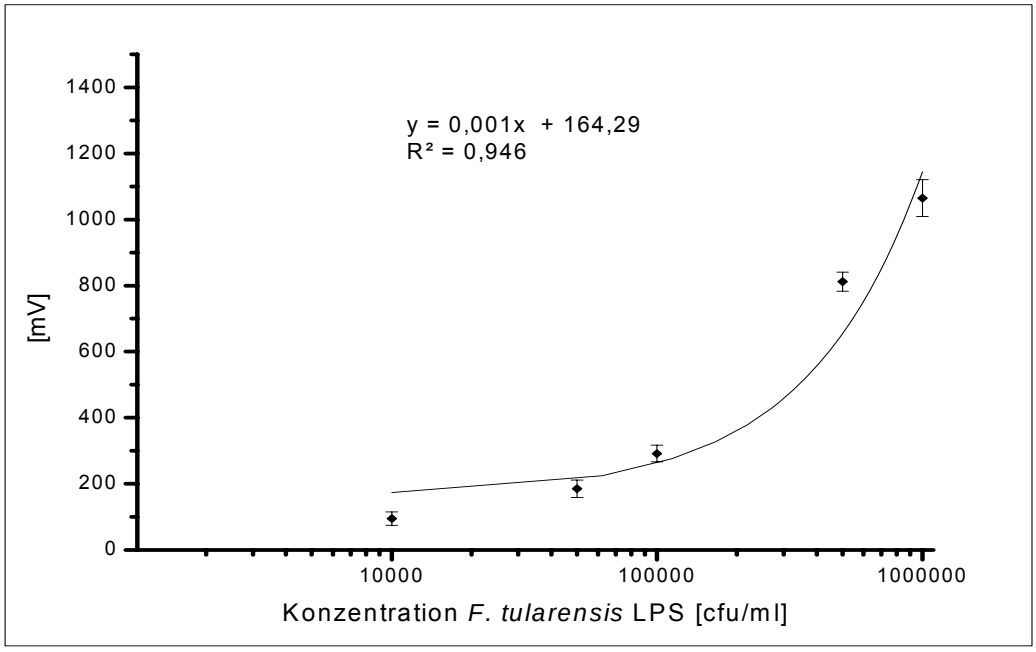


Abbildung 107 Kalibration des *F. tularensis*-Puffer mit magnetischer Extraktion.

Die Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-FT betrug 10 µg pro Säule, die Konzentration des Detektionsantikörpers anti-FTB betrug ebenfalls 10 µg pro Probe bzw. Säule. Das Probenvolumen betrug 500 µl. Die Konzentration des Antigens FT-LPS in Kaninchenserum wurde variiert.

Die Kalibration dieses Assays mit magnetischer Extraktion und Detektion ergab einen linearen Messbereich von 10^4 – 10^6 cfu FT-LPS pro ml mit einer Linearität von 0,946. Die ermittelten Werte sind deutlich höher als die Signale der Messungen in Puffer und Kaninchenserum aus Kap. 3.7.1 und Kap. 3.7.2. Die Linearität ist deutlich schlechter.

Zur weiteren Charakterisierung wurde ein Intra-Assay zur Bestimmung der Standardabweichung durchgeführt. Die getesteten Konzentrationen waren auch für diesen Test 0 cfu/ml (Blindwert), 10^4 cfu/ml, 10^5 cfu/ml und 10^6 cfu/ml. Jede Konzentration wurde 12-mal getestet. Zur Ermittlung der Standardabweichungen wurden die Netto-Signale nach Abzug der gemittelten Blindwerte verwendet.

Tabelle 29 Intra-Assay des *F. tularensis*-Assay mit magnetischer Extraktion in Puffer.

Konzentration FT-LPS [cfu/ml]	Standardabweichung [%]
0 cfu/ml (Blindwert)	13,5 %
10^4 cfu/ml	11,6 %
10^5 cfu/ml	8,0 %
10^6 cfu/ml	5,2 %
Gesamt	**9,6 %**

Die ermittelten Standardabweichungen sind deutlich höher als die entsprechenden Ergebnisse aus Kap. 3.7.1 und Kap. 3.7.2. Insbesondere das Signal des Blindwertes und der geringsten Konzentration schwank sehr stark um den Mittelwert. Bei den beiden höheren Konzentrationen wird die Standardabweichung dagegen akzeptabel, was sich auch auf den immer noch akzeptablen Gesamtwert von 9,6 % auswirkt.

3.8 Expression und Charakterisierung des P22 Tail Spike-Protein

3.8.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung

Das in diesem Kapitel behandelte Tail spike-Protein des *Salmonella*-spezifischen Phagen P22 wurde von Wolfgang Klein kloniert. Hierbei handelt es sich um ein Adhesionsprotein des Phagen P22, welches auf die Bindungsdomäne verkürzt und mit einem His_6-Tag versehen worden ist. Durch das verkürzen des Proteins konnte die Bildung von größeren Aggregaten des Proteins, sogenannten Inclusion bodies, verhindert werden. Das angefügte His6-Tag erlaubt eine schnelle und gut reproduzierbare Aufreinigung des Proteins per IMAC-FPLC (Ion Metal Affinity Chromatography – Fast Protein Liquid Chromatography). Hierbei wird eine Ni-NTA-Säule verwendet.

Zur Expression des Proteins wurde das vorhandene Plasmid in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (D3) kloniert.

Zur Testung der Expressionsleistung des transformierten Stammes wurde eine Probeexpression in Flüssigkultur durchgeführt. Hierbei wurde mit LB-Medium bei 37° C und 125 U/min bis zu einer OD von ca. 1 inkubiert. Die nun folgende Expressionsphase wurde mit 0,5 mM IPTG für 6 Stunden induziert. Anschließend wurden die Zellen durch eine Behandlung mit Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen und das enthaltene TSP-His aufgereinigt. Die Aufreinigung des TSP-His erfolgte an einer Ekta-Prime® FPLC mit einer Ni-NTA-Säule (Volumen 5 ml). Anschließend wurde eine Ultrazentrifugation (MWCO 30.000 Da) zur Aufkonzentrierung und Umpufferung der Zielfraktion durchgeführt. Von jeder Aufreinigungsfraktion wurde anschließend eine Gelelektrophorese angfertigt.

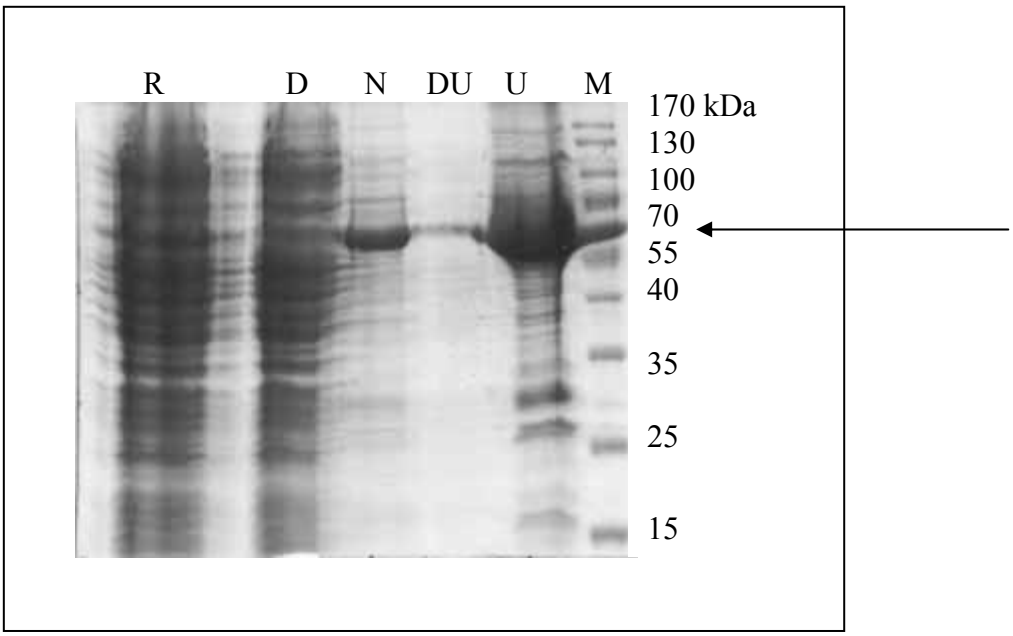


Abbildung 108 SDS-PAGE der Aufreinigung des TSP-His Proteins. R = Rohextrakt aus lysierten Zellen, D = Durchfluss der Ni-NTA-Säule, N = Zielfraktion der Ni-NTA-Säule, DU = Durchfluss der Ultrazentrifugation, U = Retentat der Ultrazentrifugation, M = Größenmarker.

Man erkennt das durch die IMAC-FPLC gut aufgereinigte und hoch konzentrierte Zielprotein in Spur N mit einem Molekluargewicht von ca. 60 kDa. Durch die Ultrazentrifugation kommt es zu einem gewissen Verlust (siehe Spur DU), das TSP-His wird aber stark aufkonzentriert. In Spur U kann man die hohe Konzentration des TSP-His im Ultrafiltrationsretentat gut erkennen. Es wurde eine solch hohe Konzentration der Probe eingesetzt, um mögliche Kontaminanten besser darzustellen. Man erkennt in Spur U mehrere Kontaminationsbanden, die aber im Vergleich zum Zielprotein gering konzentriert sind. Diese wurden bereits von Wolfgang Klein bei der Aufreinigung beobachtet. Einen Einfluss auf die Anwendung des TSP-His hatten diese Fremdproteine nicht.

Die Gewährleistung einer optimalen Proteinexpression in *E. coli* BL21 (D3) machte eine Optimierung der Expressionparameter notwendig. In einem ersten Optimierungsansatz wurde die Expression des TSP-His mit den Kulturmedien LB und TFB bei verschiedenen Induktionstemperaturen getestet. TFB-Medium enthält deutlich mehr Nährstoffe als LB und basiert auf einem 0,1 M Phosphatpuffer pH 7. Die Kulturen wurden jeweils ca. 2 Stunden bei 37°C bis zu einer OD von 0,8 vorinkubiert. Das Fermentationsvolumen betrug 250 ml in 1 L-Schikanenkolben. Danach erfolgte eine 6-stündige Induktionsphase bei variierender Induktionstemperatur und 0,5 mM IPTG. Die Schüttlergeschwindigkeit betrug

immer 125 U/min. Aufgrund der maximalen Zelldichte wurde als optimale Expressionsmethode eine Induktionstemperatur von 34° C mit einem TFB-Medium verwendet.

3.8.2 Charakterisierung

Nach Ermittlung der optimalen Expressionsparameter für das TSP wurde die Anwendbarkeit dieses Proteins in biosensorischen Applikationen analysiert.
Eine typische Anforderung an ein bilogisches Detektionsmolekül (wie z. B. Antikörper) ist die Einsatzfähigkeit im Sandwich-Prinzip. Dies bedeutet, dass zwei Detektionsmoleküle an ein Analyt-Molekül binden können. Hierdurch wird z. B. im ELISA eine Extraktion und Präsentation des Analyten aus der Probenmatrix erreicht. Der zweite Sandwich-Partner dient dann zur Markierung des extrahierten Analyten. Ist ein homologes Sandwich aus zwei gleichen Detektionsmoleülen nicht möglich, ergibt sich aber oftmals die Perspektive eines heterologen Sandwiches aus zwei unterschiedlichen Detektionsmolekülen.

Zur Ermittlung der Bindungskapazität des TSP wurden verschiedene SPR-Messungen durchgeführt. Hierfür wurde jeweils ein Bindungspartner an die Chipoberfläche immobilisiert. Dies geschah für dieses Messanordnung durch hydrophobe Wechselwirkung des Proteins mit einer alkylierten C18-Oberfläche des Goldchips. Nach Blockierung aller freien Bindungsstellen mit BSA (75 µg/ml) wurde der Analyt LPS mit einer Konzentration von 150 µg/ml zugegesetzt. Nach einem Spülschritt erfolgte die Zugabe des zweiten Detektionsmoleküls. Alle Lösungen und Spülschritte wurden mit 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 verdünnt und durchgeführt.

Zuerst wurde ein homologes Sandwich mit TSP getestet. Abb. 109 zeigt eine schematische Darstellung der Messanordnung. Die Konzentration des TSP betrug 50 µg/ml.

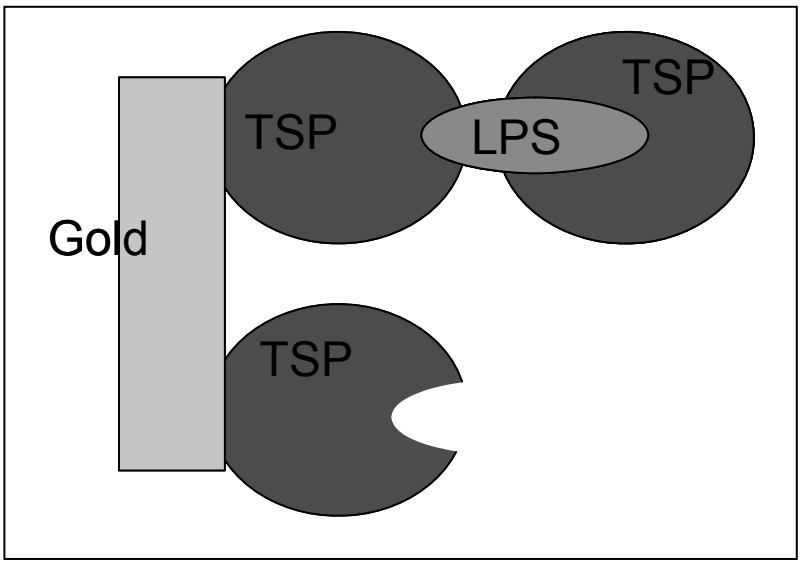


Abbildung 109 Schematische Darstellung des homologen Sandwich-Prinzips mit TSP.
TSP = Tail spike-Protein, LPS = *S. typhimurium* Lipopolysaccharid.

Abbildung 110 zeigt das SPR-Sensogramm dieser Messung.

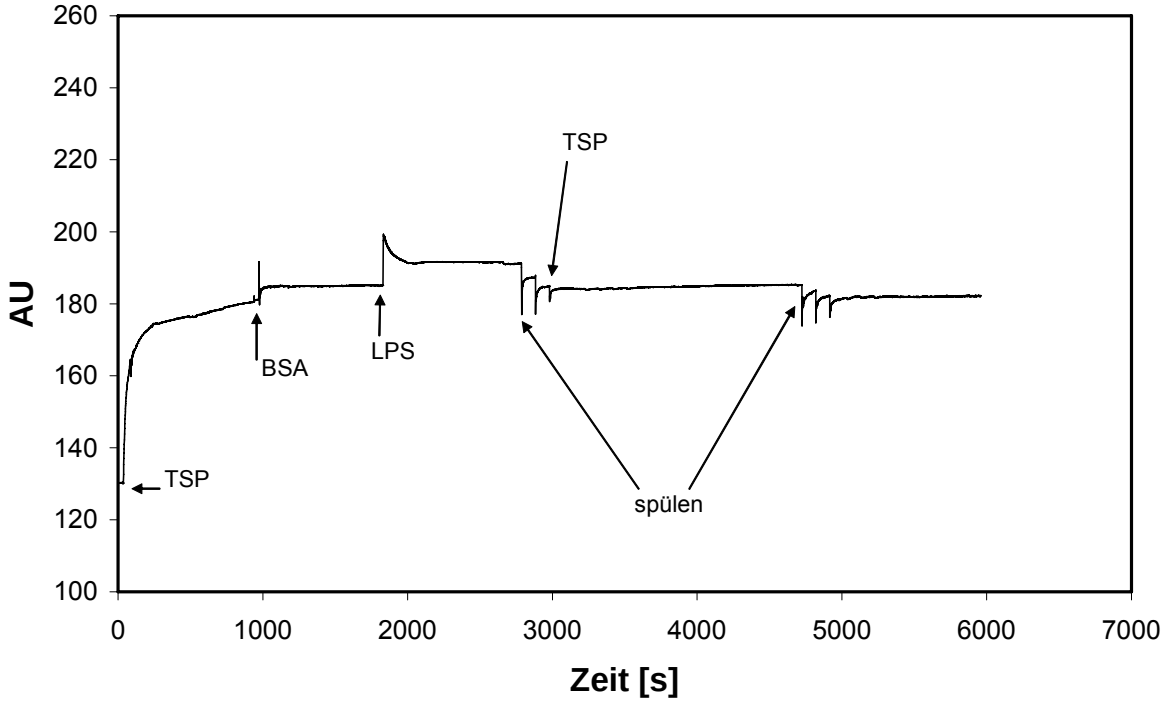


Abbildung 110 SPR-Sensogramm des homologen Sandwiches mit TSP.
TSP = Tail spike-Protein, BSA = Bovine serum albumin, LPS = *S. typhimurium* Lipopolysaccharid.

In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass das im zweiten Schritt zugegebene TSP nicht an die Oberfläche bindet. Nach dem Spülschritt ist das Signal sogar geringer als vor Zugabe des TSP. Die Anwendung von TSP in einem homologen Sandwich ist also anscheinend nicht möglich.

In einem weiteren Schritt wurde ein heterologes Sandwich-Prinzip getestet. Hierfür wurde TSP an die Chipoberfläche immobilisiert und ein polyklonaler IgG Antikörper gegen das *S. typhimurium* LPS als zweites Detektionsmolekül eingesetzt. Die Konzentration des TSP betrug 50 µg/ml, die des anti-ST Antikörpers 100 µg/ml.

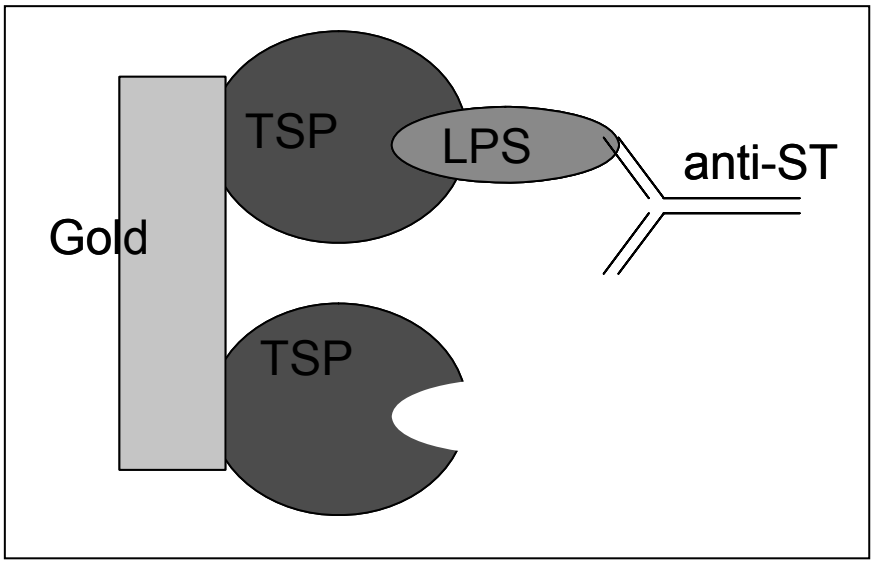


Abbildung 111 Schematische Darstellung des heterologen Sandwich-Prinzips.

TSP = Tail spike-Protein, LPS = *S. typhimurium* LPS, anti-ST = Antikörper.

Abbildung 112 zeigt ein SPR-Sensogramm dieser Messung. Auch diese Messung wurde 3-mal mit demselben Ergebnis ausgeführt.

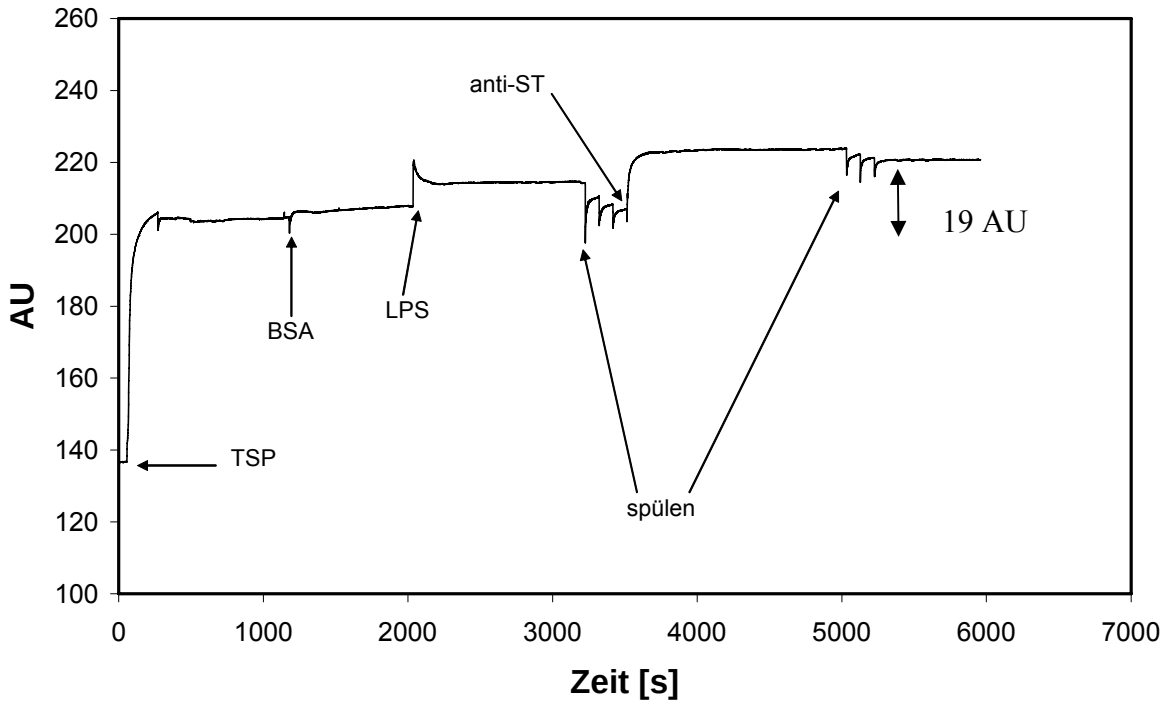


Abbildung 112 SPR-Sensogramm des heterologen Sandwiches mit TSP und anti-ST Antikörper. TSP = Tail spike-Protein, BSA = Bovine serum albumin, LPS = *S. typhimurium* Lipopolysaccharid, anti-ST = Antikörper.

Der zugegebene anti-ST Antikörper erzeugt einen Anstieg des Messsignals (ca. 19 AU). Dies bedeutet, dass der anti-ST Antikörper an präsentiertes LPS auf der Chipoberfläche ankoppelt. Die Bindung scheint auch stabil und nich unspezifisch zu sein, da nach dem Spülschritt keine starke Abnahme des Signals erfolgt. Der Zuwachs des Messsignals ist für einen Antikörper allerdings gering.

Diese Messung zeigt, dass die Nutzung des TSP in einem heterologen Sandwich zumindest möglich ist, wenn auch mit einem nur geringen Signal des zweiten Detektionsmoleküls.

Als Kontrollmessung wurde ein homologes Sandwichprinzip mit dem bereits oben genutzen anti-ST Antikörper getestet. Die Antikörperkonzentration betrug jeweils 100 µg/ml.

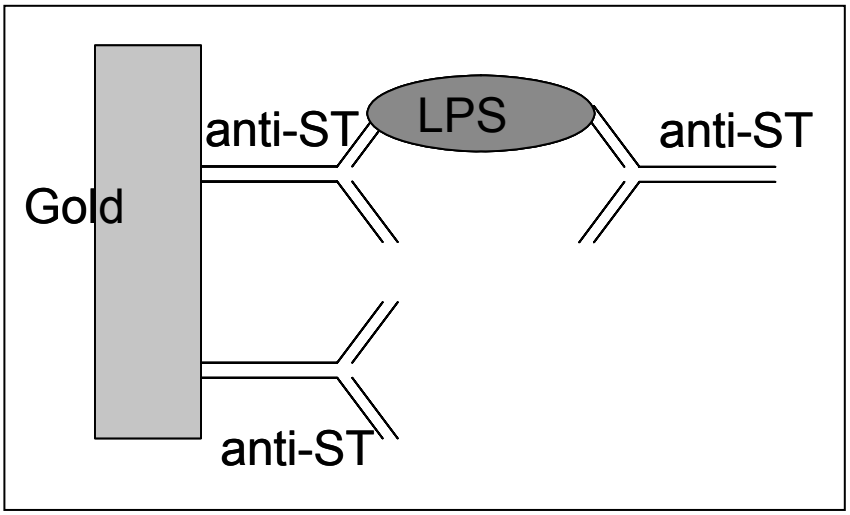


Abbildung 113 Schematische Darstellung des homologen Sandwich-Prinzips mit anti-ST Antikörper.
LPS = *S. typhimurium* LPS, anti-ST = Antikörper.

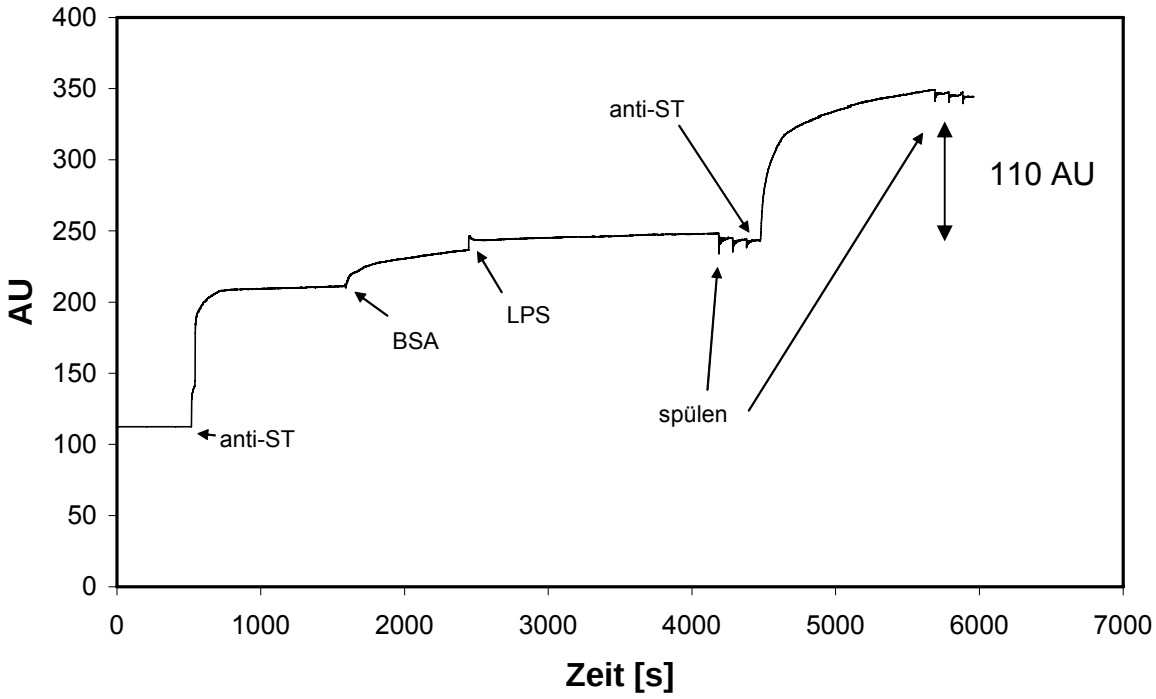


Abbildung 114 SPR-Sensogramm des homologen Sandwiches mit anti-ST Antikörper.
BSA = Bovine serum albumin, LPS = *S. typhimurium* Lipopolysaccharid, anti-ST = Antikörper.

Man erkennt einen sehr deutlichen Anstieg des Signals bei Zugabe des zweiten anti-ST Antikörpers (ca. 110 AU). Die Bindung ist auch nach Abschluss des Spülschrittes stabil. Diese Kontrolle zeigt ein typisches homologes Sandwich aus zwei Detektionsmolekülen. Die Probleme bei der Bildung eines homologen oder heterologen Sandwich-Prinzips zur Detektion des *S. typhimurium* LPS müssen also im TSP-Molekül begründet liegen.

Zur Erklärung dieses Problems wurde eine Modellierung eines homologen Sandwiches mit TSP durchgeführt. Hierbei wurde auf Kristallographiedaten des P22 Tail spike-Protein (PDB-Code: 1TYX) von STEINBACHER ET AL. (1996) zurückgegriffen. Für die Hilfe bei diesem Problem möchte ich mich bei Herrn Patrick Pfeffer bedanken.

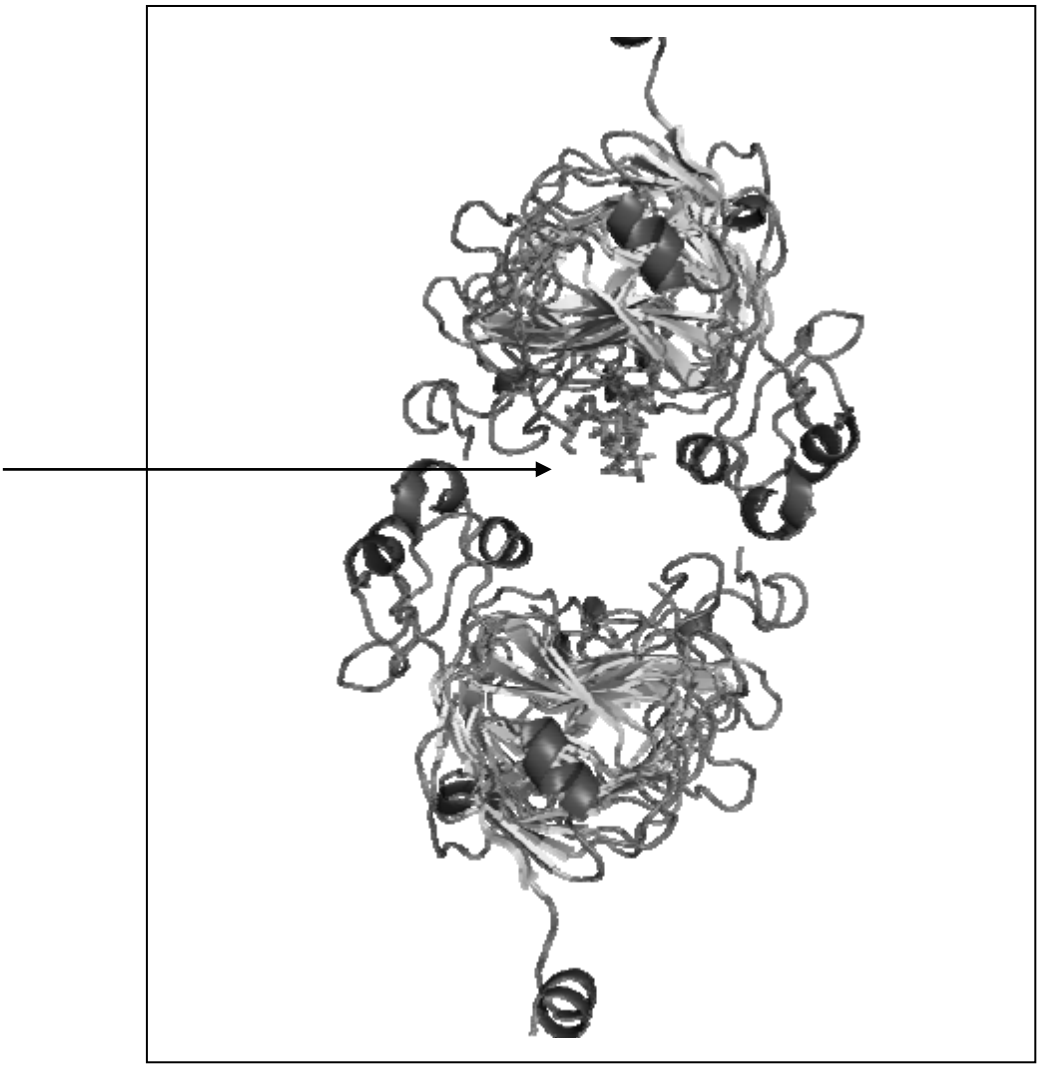


Abbildung 115 Modelllierung einer homologen Sandwich-Anordnung mit TSP.
Pfeil = *S. typhimurium* LPS.

Die Bindungstasche bzw. Lage des gebundenen LPS im TSP-Molekül scheint sterische Probleme für die Bildung einer Sandwich-Anordnung zu bewirken. Das zweite TSP-Molekül bekommt keine Möglichkeit der Kopplung an das gebundene und präsentierte LPS. Zur weiteren Charaketrisierung der Bindungstasche wurde eine Modellierung des LPS in der Bindungstasche durchgeführt.

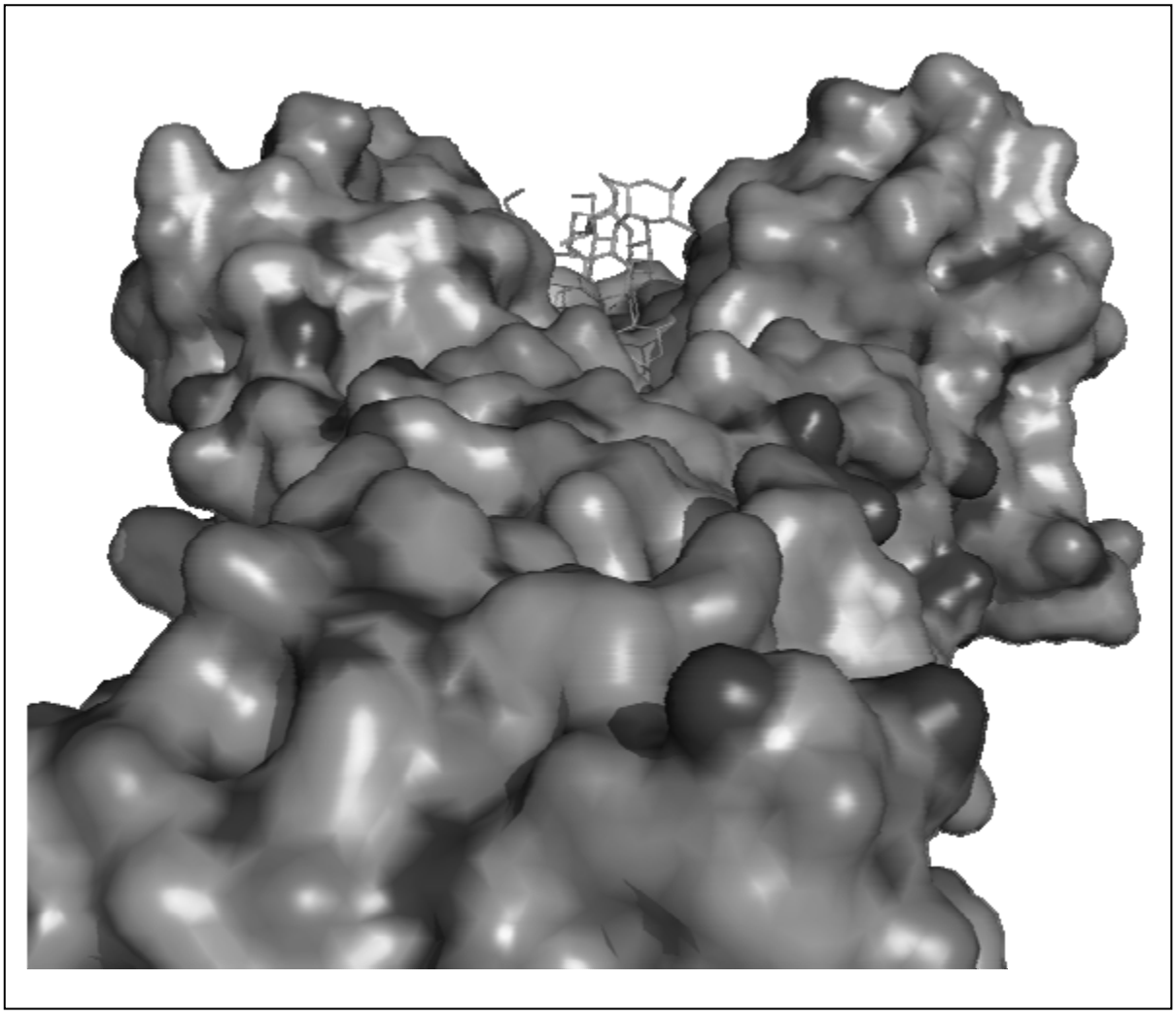


Abbildung 116 Modellierung des *S. typhimurium* LPS nach Bindung an das TSP-Molekül.

Die Bindungstasche des TSP-Moleküls ist sehr eng, tief und lang. Hierdurch wird das LPS bei einer Bindung sehr tief eingebettet.

Der Abstand zwischen dem tiefstem (Thr 247) und höchstem (Gly 393) Aminosäurerest der Bindungstasche beträgt 29,9 Å. Das Gesamtvolumen der Bindungstasche beträgt ca. 624 Å^3. Der Abstand zwischem dem am weitesten herausstehendem Atom des LPS und dem umgebenden TSP beträgt 8,8 Å. Das bedeutet, das LPS liegt extrem tief in der Bindungstasche vergraben.

Das LPS steht somit für eine weitere Bindungstasche dieser Konformation einfach nicht zu Verfügung. Eine Nutzung als Sandwich-Partner ist durch diese Bindungstaschengeometrie sehr limitiert, da es immer zu sterischen Problemen der Molekülbindung kommen wird.

3.9 Diagnostik von S. typhimurium mit magnetischer Detektion

Aufbauend auf die positiven Ergebnisse der *S. typhimurium*-Detektion mit TSP und dem polyklonalen anti-ST Antikörper erschien eine Übertragung der immunologischen Systeme auf die magnetische Detektion als sinnvoll. Da eine Detektion von *S. typhimurium* hauptsächlich im Bereich der Lebensmitteldiagnostik eingesetzt wird, wurde versucht, einfache und robuste Detektionssysteme zu entwickeln. Zusätlich wurden typische Realmatrices der Lebensmittelindustrie verwendet.

3.9.1 Detektion mit einem Sandwich-Prinzip

Wie bereits in Kap. 3.8 bschrieben, ist ein Einsatz des TSP in Sandwich-Arrangements aufgrund sterischer Probleme nicht möglich. Die Verwendung des polyklonalen anti-ST Antikörpers in einer Sandwich-Anordnung funktionierte allerdings sehr gut, daher wurde dieses Prinzip zur Detektion mit Antikörpern verwendet.

Zur Etablierung dieses Messprinzips wurde der anti-ST Antikörper adsorptiv an den PE-Sinterkörper immobilisiert und zur Extraktion des Analyten aus der Probenmatrix verwendet. Analyte bzw. Antigen dieses Antikörpers ist das *S. typhimurium* Lipopolysaccharid (LPS). Dieser extrahierte und präsentierte Analyt wird dann von einem zweiten anti-ST Detektionsantikörper markiert. Der Detektionsantikörper ist über eine Biotin-Funktion an das Magnetic Bead mit Streptavidinoberfläche gekoppelt. Abbildung 117 zeigt eine schematische Darstellung des Messprinzips.

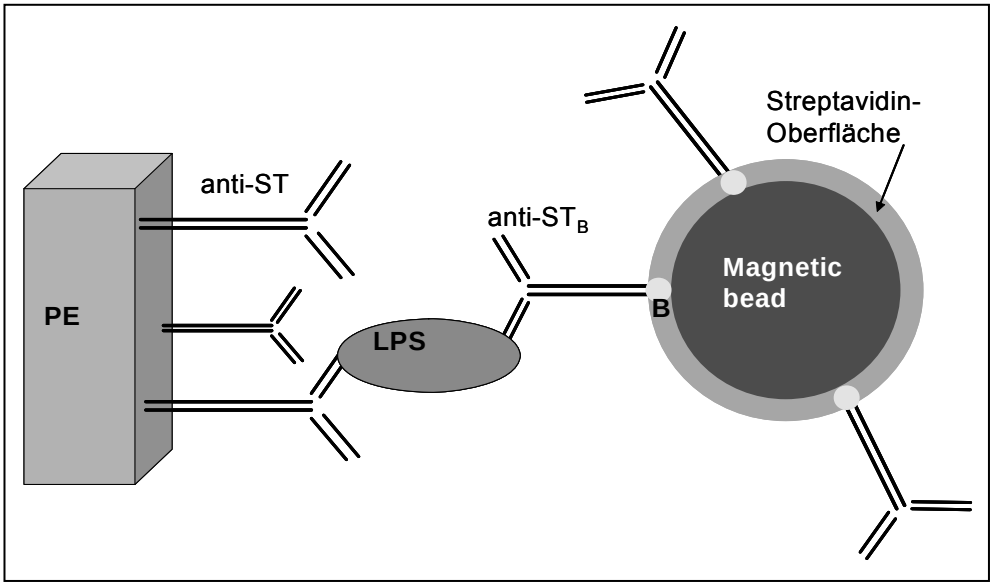


Abbildung 117 Schematische Darstellung des Messprinzips im Sandwich-Verfahren.
PE = Polyethylensinterkörper, anti-ST = Antikörper, LPS = Lipopolysaccharid, B = Biotinfunktion**.**

Ausgehend von vorherigen Ergebnissen wurde der Extraktionsantikörper adsorptiv an die PE-Sinterkörper immobilisiert. Hierzu wurde der bereits bekannte Immobilisierungspuffer 0,1 M Carbonat-Puffer pH 9,5 verwendet. Zur Testung der optimalen Extraktionsantikörperkonzentration wurde der beschriebene Assay durchgeführt.
Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen des Extraktionsantikörpers an den PE-Sinterkörper immobilisiert und verbleibende freie Bindungsstellen mit caseinhaltigem 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 (10 % Caseinpuffer v/v) blockiert. Nach Zugabe des Analyten (LPS) in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 wurde der biotinylierte Detektionsantikörper mit Magnetic Beads zugegeben. Die Magnetic Beads wurden wiederum in einer Verdünnung von 1:100 (v/v) durch Blindsäulen filtriert und dann mit 10 µg anti-ST$_B$ Detektionsantikörper in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 gekoppelt. Der Magnetic Bead-Lösung wurde außerdem 10 % Caseinpuffer (v/v) zugesetzt.

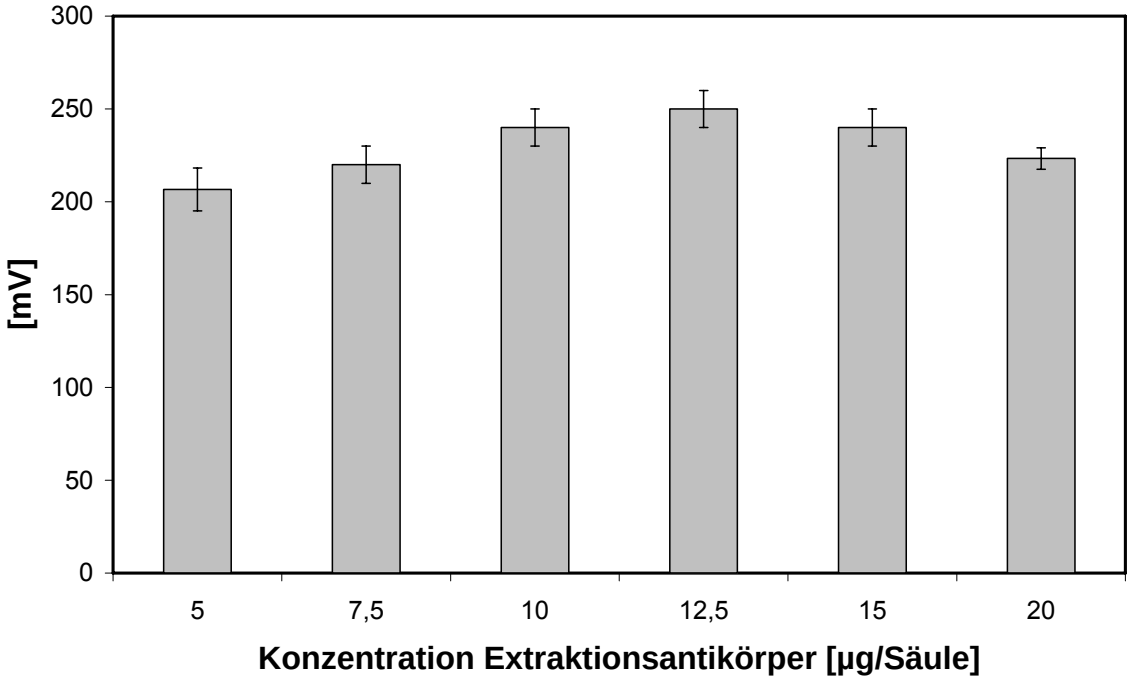


Abbildung 118 Optimierung der Extraktionsantikörperkonzentration. Die Konzentration des Analyten betrug 1 µg LPS pro ml, n=3.

Die optimale Konzentration des immobilisierten Extraktionsantikörpers betrug 12,5-15 µg anti-ST pro PE-Sinterkörper. Es wurde mit der Konzentration 12,5 µg/Säule weitergearbeitet.

Außerdem erfolgte eine Optimierung der Detektionsantikörperkonzentration. Hierzu wurde 12,5 µg Extraktionsantikörper pro PE-Sinterkörper immobilisiert und der Assay wie oben beschrieben durchgeführt.

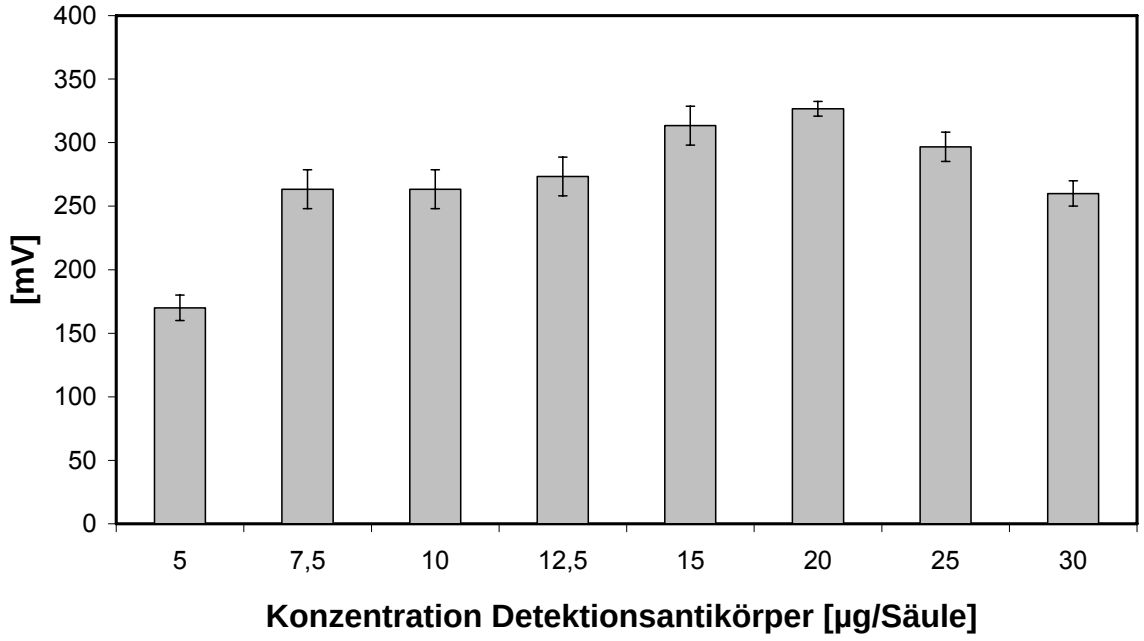


Abbildung 119 Optimierung der Detektionsantikörperkonzentration. Die Konzentration des Analyten betrug 1 µg LPS pro ml, n=3.

Die optimale Konzentration des biotinylierten Detektionsantikörpers anti-ST_B zur Kopplung an die Magnetic Beads betrug 20 µg pro Säule.

Die Assay-Durchführung erfolgte jeweils in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3. Diese Molarität und pH-Stärke hat sich in vorhergehenden Ergebnissen immer als optimal dargestellt.

Hieraus erfolgte die Bestimmung einer Kalibrationsreihe zur Detektion des *S. typhimurium* LPS in Puffer. Die verwendeten Antikörperkonzentrationen entsprachen den optimierten Werten, d. h. 12,5 µg Extraktionsantikörper und 20 µg Detektionsantikörper pro ABICAP®-Säule.

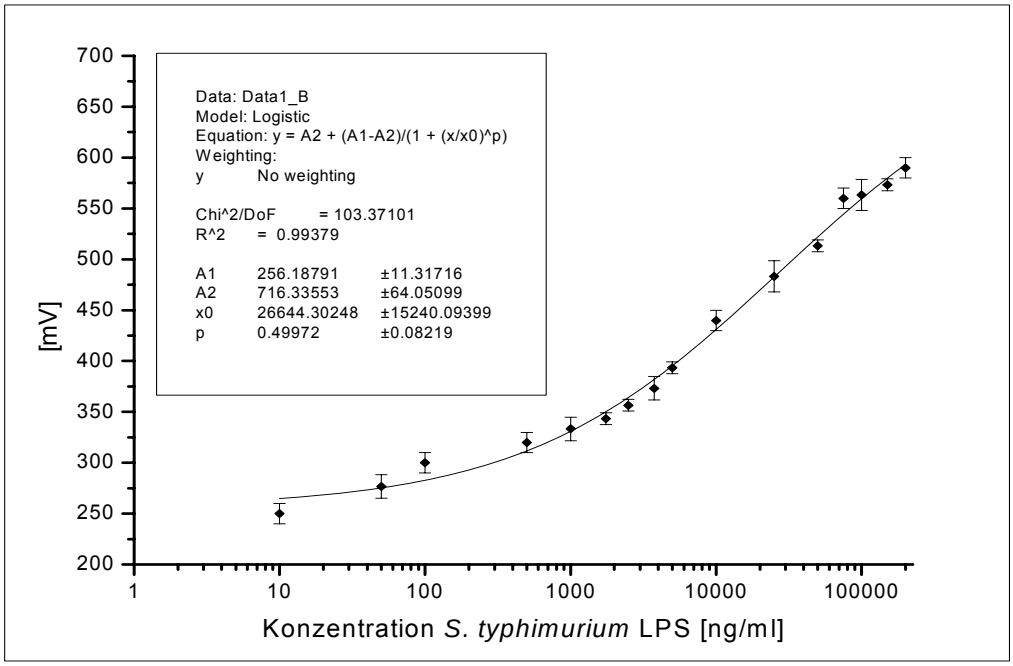


Abbildung 120 Kalibrationsreihe zur Detektion von *S. typhimurium* LPS in Puffer. Der Blindwert (0 ng LPS/ml) betrug 230 mV.

Aus dieser Messreihe wurde folgende Kalibrationsgerade abgeleitet.

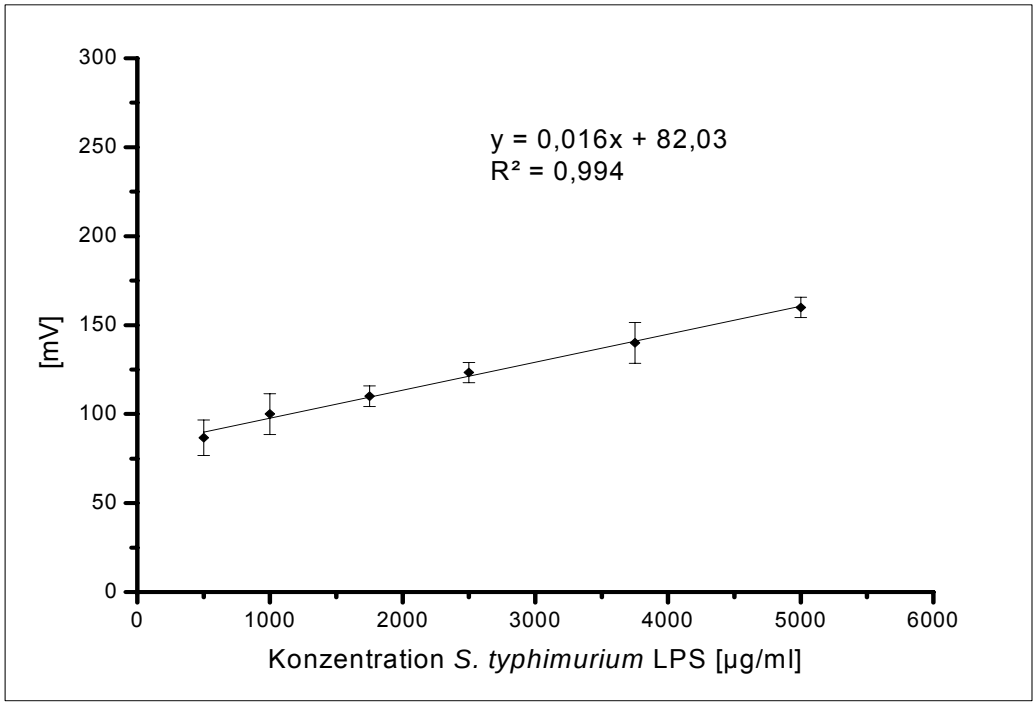


Abbildung 121 Linearer Kalibrationsbereich zur Detektion von *S. typhimurium* LPS in Puffer.

Der lineare Messbereich dieser Kalibrationsreihe betrug 500-5000 ng/ml LPS bei einem Probenvolumen von 500 µl. Die Linearität der Ausgleichsgerade ist mit 0,994 relativ gut. Zur Bestimmung der Variationskoeffizienten wurde ein Intra-Assay durchgeführt. Die jeweils 12-mal bestimmten Konzentrationen waren 0 ng/ml (Blindwert), 100 ng LPS pro ml, 1000 ng/ml und 10000 ng/ml LPS.

Tabelle 30 Intra-Assay des *S. typhimurium*-Assays im Sandwich-Prinzip in Puffer.

Konzentration FT-LPS [cfu/ml]	Standardabweichung [%]
0 ng/ml (Blindwert)	6,4 %
100 ng/ml	4,1 %
1000 ng/ml	2,9 %
10000 ng/ml	2,1 %
Gesamt	**3,9 %**

Die bestimmten Standardabweichungen sind mit durchschnittlich 3,9 % für einen immunologischen Test sehr gut. Man erkennt wie bei bereits vorher beschriebenen Intra-Assays, dass die Blindwerte und die Messwerte der sehr niedrigen Konzentrationen am Stärksten variieren.
Die Anwendbarkeit dieser Messanordnung in Puffer konnte gezeigt werden. In einem weiteren Schritt wurde nun die Anwendbarkeit in Realmatrices getestet.

Eine typische Realmatrix der Lebensmittelindustrie zur Testung auf Salmonellen ist das Chicken Carcass Wash Water (CCWW). Diese wurde nach der beschriebenen Anleitung hergestellt und anstelle von Puffer als Realprobenmatrix zur Messung eingesetzt. Das zu detektierende LPS wurde dotiert.

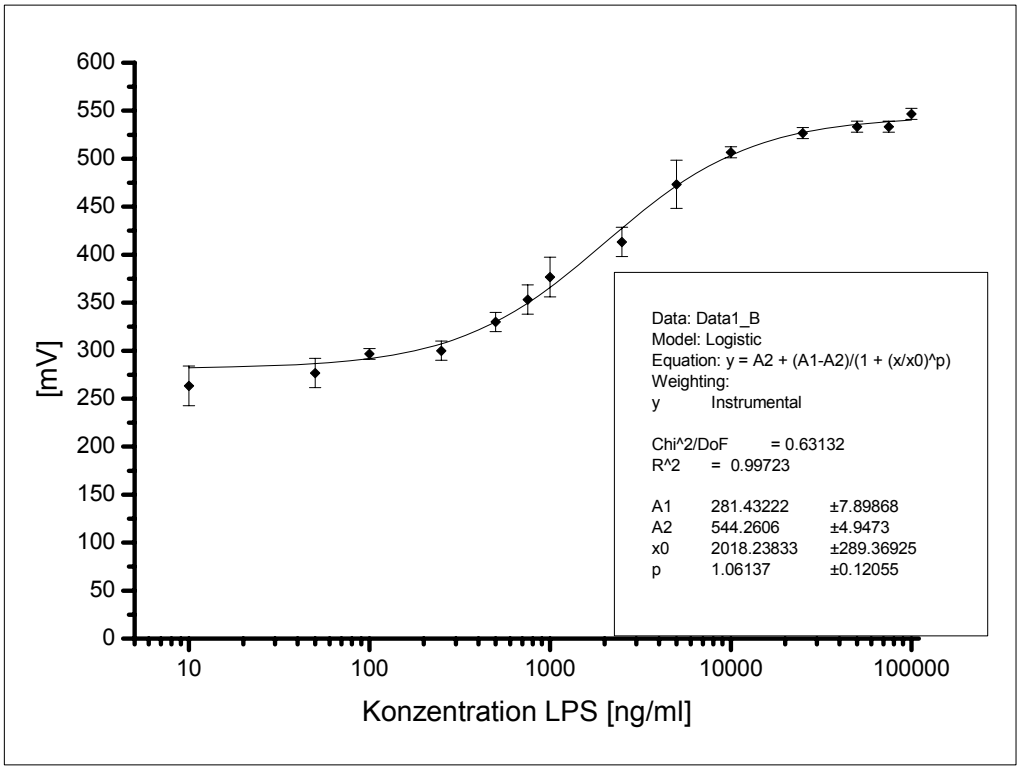


Abbildung 122 **Kalibrationsreihe der Detektion von *S. typhimurium* LPS in CCWW.** Der Blindwert (0 ng LPS/ml) betrug 235 mV.

Bei der Analyse dieser Kalibrationsmessungen wurde ein linearer Messbereich festgestellt.

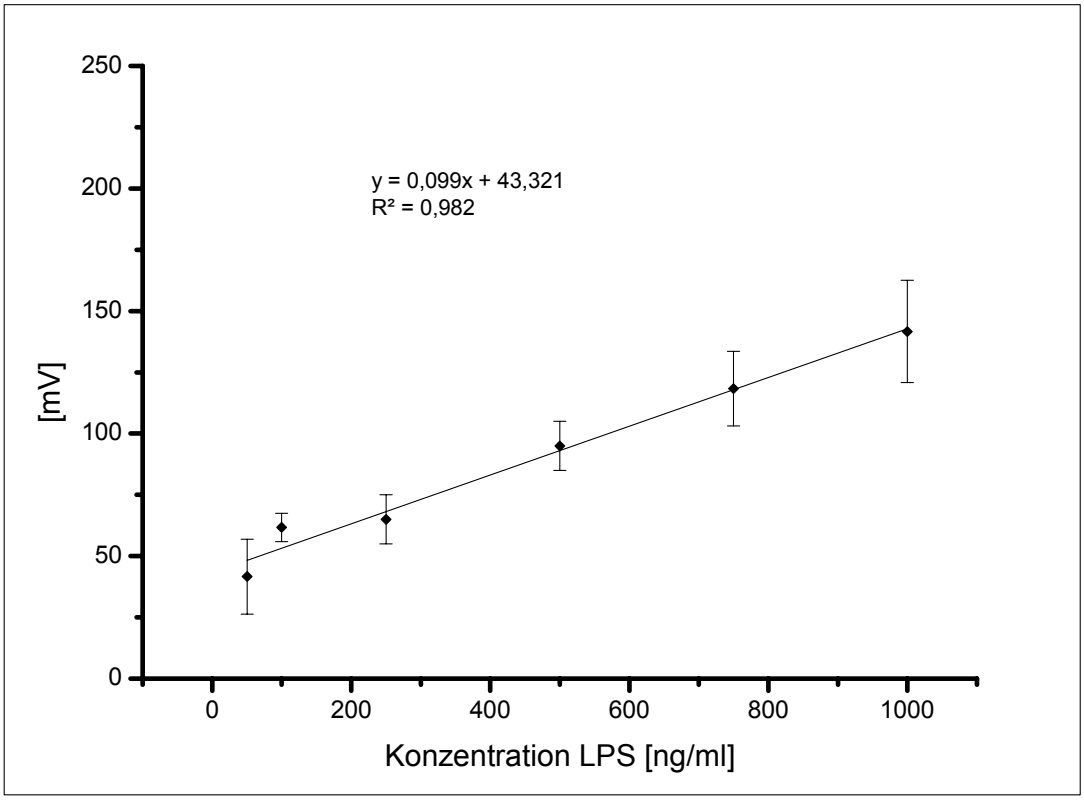


Abbildung 123 Linearer Messbereich der Detektion von *S. typhimurium* LPS in CCWW.

Der analysierte lineare Messbereich erlaubt eine Bestimmung der LPS-Konzentration in CCWW von 50 – 1000 ng pro ml CCWW. Auch bei dieser Kalibrationsreihe ist die Linearität der Ausgleichsfunktion mit 0,982 relativ gut. Zur Bestimmung der Standardabweichungen wurde ebenfalls ein Intra-Assay durchgeführt. Die getesteten LPS-Konzentrationen waren 0 ng/ml (Blindwert), 100 ng LPS pro ml, 1000 ng/ml und 10000 ng/ml LPS.

Tabelle 31 Intra-Assay des *S. typhimurium*-Assays im Sandwich-Prinzip in CCWW.

Konzentration FT-LPS [cfu/ml]	Standardabweichung [%]
0 ng/ml (Blindwert)	8,2 %
100 ng/ml	4,8 %
1000 ng/ml	4,2 %
10000 ng/ml	3,1 %
Gesamt	**5,1 %**

Auch diese Standardabweichungen sind analog zur Bestimmung in Puffer für einen immunologischen Test in einer komplexen Realmatrix sehr gut.

Zusätzlich wurde auch für diesen Assay neben der sequentiellen Messtechnik die magnetische Extraktion getestet. Hierbei wurden Detektionsantikörper und Magnetic Beads direkt in die dotierte CCWW-Probe gegeben und für eine Stunde schüttelnd bei 250 U/min inkubiert. Anschließend wurden die Magnetic Beads magnetisch abgetrennt und in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 mit 10 % Caseinpuffer (v/v) resuspendiert und über die Säule gegeben. Nach einem abschließenden Spülschritt mit PBS-Puffer wurde die Säule dann vermessen.
Zur Testung der magnetischen Extraktion in CCWW wurde eine Konzentrationsreihe von 50-1000 ng/ml LPS analysiert.

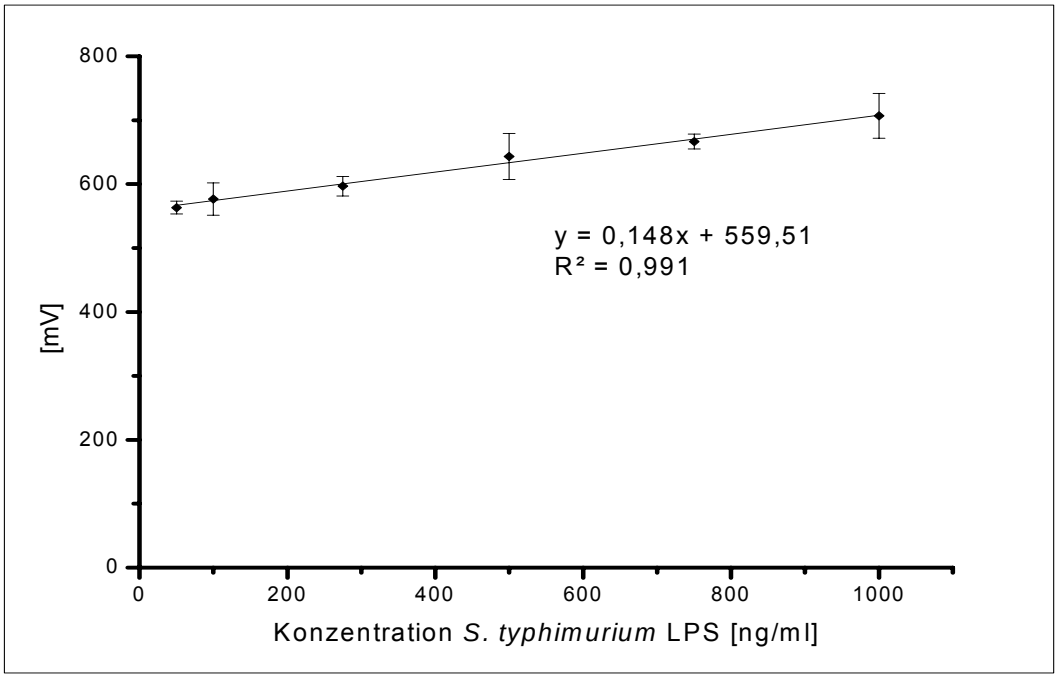


Abbildung 124 **Kalibrationsreihe der Detektion von *S. typhimurium* LPS in CCWW mit magnetischer Extraktion.**

Die Linearität der Ausgleichsfunktion ist mit 0,991 vergleichbar zur sequentiellen Detektion. Allerdings ist die Steigung der Ausgleichsfunktion fast doppelt so hoch wie bei der sequentiellen Bestimmung. Dies kann wie in vorherigen Test mit der nicht erfolgten Filtration der Magnetic Beads bei der magnetischen Extraktion begründet liegen.

Außer CCWW wurde auch die Realmatrix Salad Wash Water (SWW) mit magnetischer Extraktion getestet. Hierbei wurden folgende Kalibrationsreihen ermitelt.

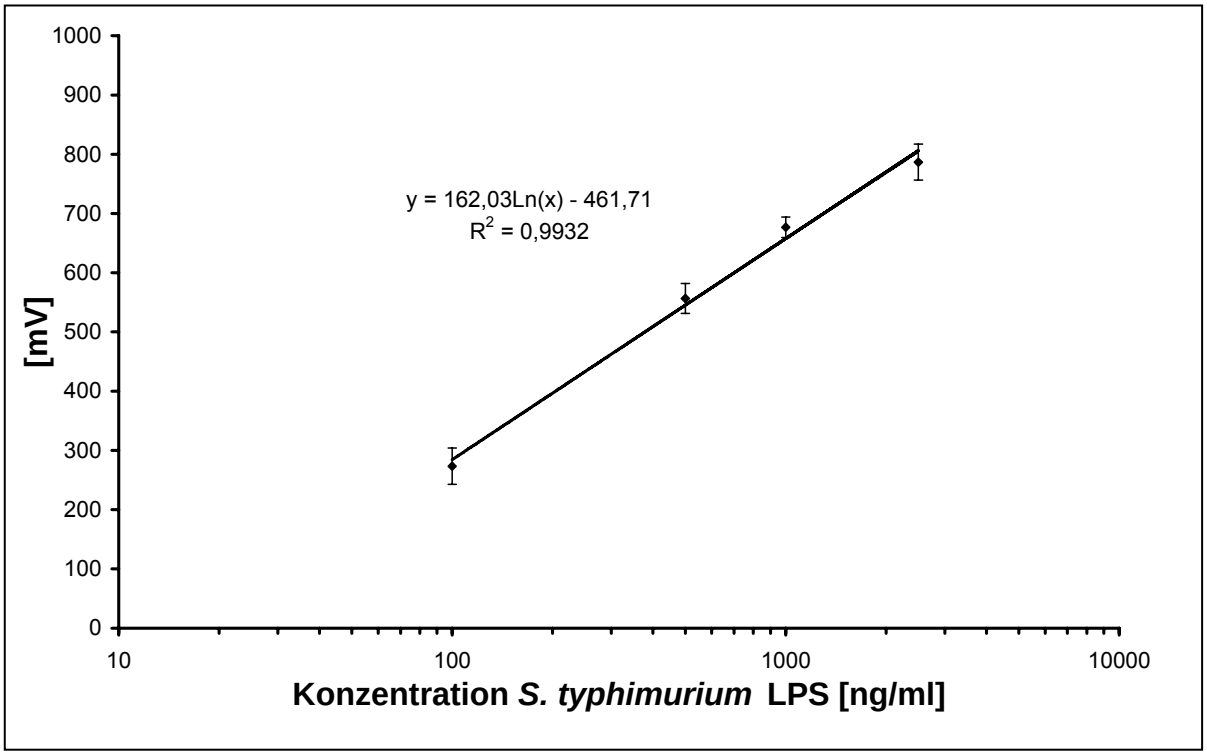


Abbildung 125 Kalibrationsreihe der Detektion von *S. typhimurium* LPS in SWW.

Der Messbereich der Detektion von *S. typhimurium* LPS mit magnetischer Extraktion in SWW zeigte einen logarithmischen Messbereich von 100-2500 ng LPS pro ml.

Als weitere Probenmatrix wurde auch Milch eingesetzt. Hierbei handelte es sich um H-Milch mit einem Fettgehalt von 1,5 %. Das zu detektierende *S. typhimurium* LPS wurde dotiert. In Abb. 126 ist wiederum die Kalibration mit magnetischer Extraktion gezeigt.

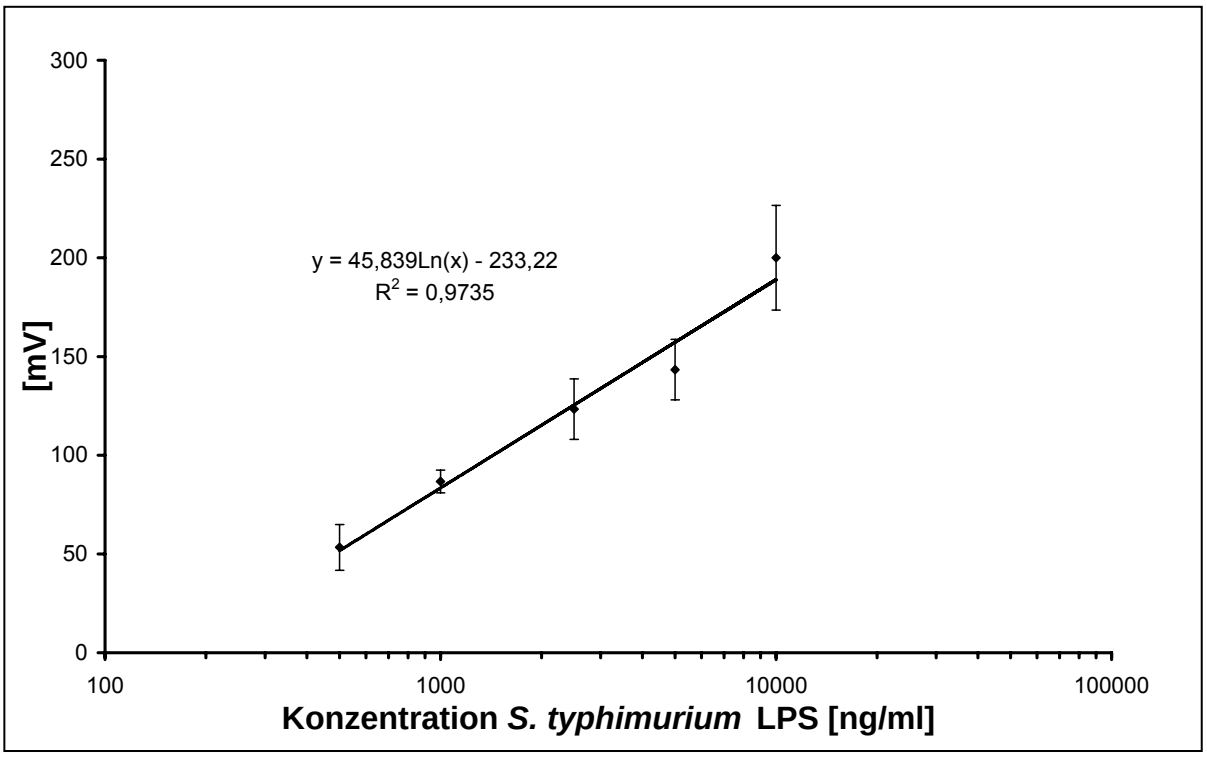


Abbildung 126 Kalibrationsreihe der Detektion von *S. typhimurium* LPS in Milch.

Das eingesetzte Detektionssystem erlaubt auch eine Kalibration in Milch. Die Auswertung erfolgt wiederum über eine logarithmische Ausgleichsfunktion.

Als abschließende Realmatrix für die *S. typhimurium* LPS-Detektion wurde Eigelb verwendet. Das Eigelb wurde hierfür vom Eiweiß getrennt, das Eigelb 1:1 (v/v) mit 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 versetzt und homogenisiert. Dieses sehr viskose Medium wurde ebenfalls per magnetischer Extraktion bearbeitet. Das zu detektierende LSP wurde in das Eigelb dotiert. Abb. 127 zeigt die Kalibrationsreihe dieser Realmatrix.

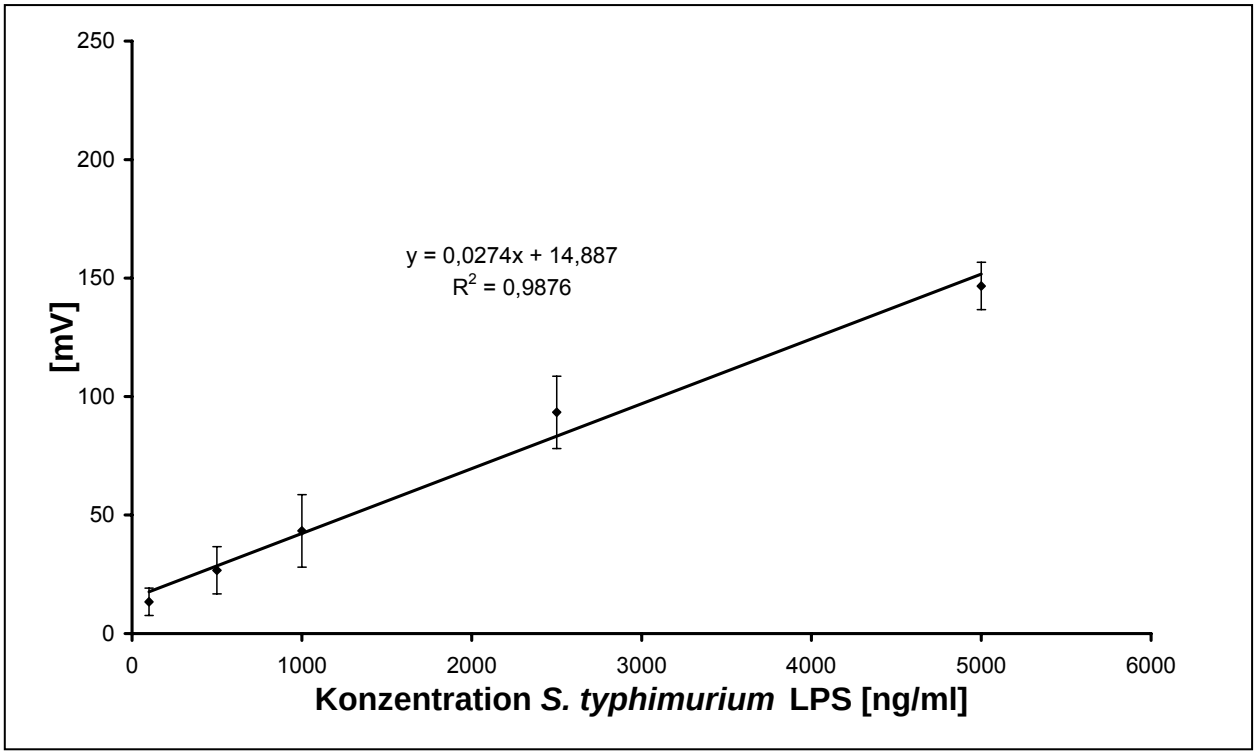


Abbildung 127 **Kalibrationsreihe der Detektion von *S. typhimurium* LPS in Eigelb mit magnetischer Extraktion.**

Das verdünnte Eigelb stellte sich als sehr komplizierte Probenmatrix dar. Besonders problematisch war die schnelle Verklumpung des Eigelbs bei Kontakt mit Luftsauerstoff. Daher wurden die Proben mit PBS-Puffer 1:1 (v/v) verdünnt. Der getestete Messbereich beträgt hier 100-5000 ng LPS pro ml Eigelb. Im Gegensatz zu den anderen Realmatrices ergibt sich hier ein linearer Messbereich wie bei der Detektion in Puffer. Dies kann durch die Verdünnung des Eigelbs mit Puffer bewirkt worden sein. Die Linearität der Ausgleichsgerade ist mit 0,9876 für eine solch komplexe und schwierige Probenmatrix aber gut.

3.9.2 Direkte Detektion von *S. typhimurium*

Als Alternative zum häufig eingesetzten Sandwich-Detektionsprinzips erschien auch eine direkte Detektion mit nur einem Antikörper als sinnvolle Variante der *S. typhimurium* Diagnostik. Zusätzlicher Vorteil eines direkten System mit nur einem biologischen Detektionsmolekül ist die Anwendbarkeit des P22 Tail spike Proteins (TSP), dass wie in Kap. 3.8 in Sandwich-Arrangements bisher nicht einsetzbar war.

Da die notwendige Spezifität der Detektion den Einsatz des Detektionsmoleküls in Verbindung mit den Magnetic Beads notwendig macht, ist die Extraktion des Analyten aus der Probe und seine Präsentation auf dem PE-Sinterkörper der ABICAP®-Säule der entscheidene Schritt dieses Detektionsprinzips. Wird der Analyt dann präsentiert, kann das Detektionsmolekül (Antikörper oder TSP), gekoppelt an das Magnetic Bead, den Analyt markieren und somit detektieren.
Hierfür wurde eine spezielle Eigenschaft des PE-Sinterkörpers eingesetzt, der sonst der Immobilisierung von Biomolekülen dient. Bei einem pH-Wert von 9,5 mit Immobilisierungspuffer (0,1 M Carbonat-Puffer) lagern sich Biomoleküle adsorptiv an die Oberfläche des PE-Sinterkörpers. Betrachtet man die Bakterienzelle ebenfalls als Ansammlung komplexer Biomoleküle, so erscheint es möglich, dass auch Bakterienzellen aus einer Probe auf einem PE-Sinterkörper immobilisiert werden können. Durch die Immobilisierung werden die *S. typhimurium*-Zellen nicht nur aus der Probe extrahiert, sondern sie werden anschließend auch präsentiert und können dann markiert werden.

Zur Anwendung dieses Prinzips wurden Proben in Immobilisierungspuffer (0,1 M Carbonat-Puffer pH 9,5) aufgenommen und über die Säule gegeben. Anschließend wurden verbleibende Bindungsstellen blockiert (10 % Caseinpuffer in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3) und die Detektionsmolekül-Magnetic Beads-Konjugate in Messpuffer (0,15 M PBS-Puffer pH 7,3) über die Säule gegeben. Nach einem anschließenden Spülschritt mit Messpuffer wurde die Säule vermessen.

Im Rahmen einer zweiten direkten Detektionsmethode wurden silanisierte PE-Sinterkörper eingesetzt. Die Affinität von Bakterien zu silanisierten PE-Sinterkörpern bei schwach sauem pH wurde bereits von HOLLÄNDER ET AL. (2005) gezeigt. Die Silanisierung der PE-Sinterkörper erfolgte gemäß Kap. 2. Als Immobilisierungspuffer wurde ein 0,1 M Citrat-Puffer bei pH 5,0 verwendet. Analog zur oben beschriebenen Methode kommt es zu einer Immobilisierung der in der Probe enthaltenen Bakterienzellen. Diese können anschließend mit adequaten Detektionsmolekülen markiert werden. Hierfür wurden Proben in Immobilisierungspuffer (0,1 M Citrat-Puffer pH 5,0) aufgenommen und über die Säule gegeben. Anschließend wurden verbleibende Bindungsstellen blockiert (10 % Caseinpuffer in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3) und die Detektionsmolekül-Magnetic Beads-Konjugate in Messpuffer (0,15 M PBS-Puffer pH 7,3) über die Säule gegeben. Nach einem anschließenden Spülschritt mit Messpuffer wurden auch diese Säule vermessen.

3.9.2.1 Direkte Detektion mit Antikörper (pH 9,5)

Eine erste Testung dieses Detektionsprinzips erfolgte mit dem polyklonalen anti-ST Antikörper. Dieser ist gegen das *S. typhimurium* LPS gerichtet. Als zu detektierendes Element wurden inaktivierte *S. typhimurium* CCUG 11732-Zellen verwendet. Die Inaktivierung der Bakterien erfolgte durch Inkubation mit 0,5 % Thimerosal. Inaktivierte S. *typhimurium*-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Kämpfer der Universität Gießen in einer Stammkonzentration von 10^9 cfu/ml zur Verfügung gestellt.

Abbildung 128 zeigt eine schematische Darstellung des angestrebten Messprinzips.

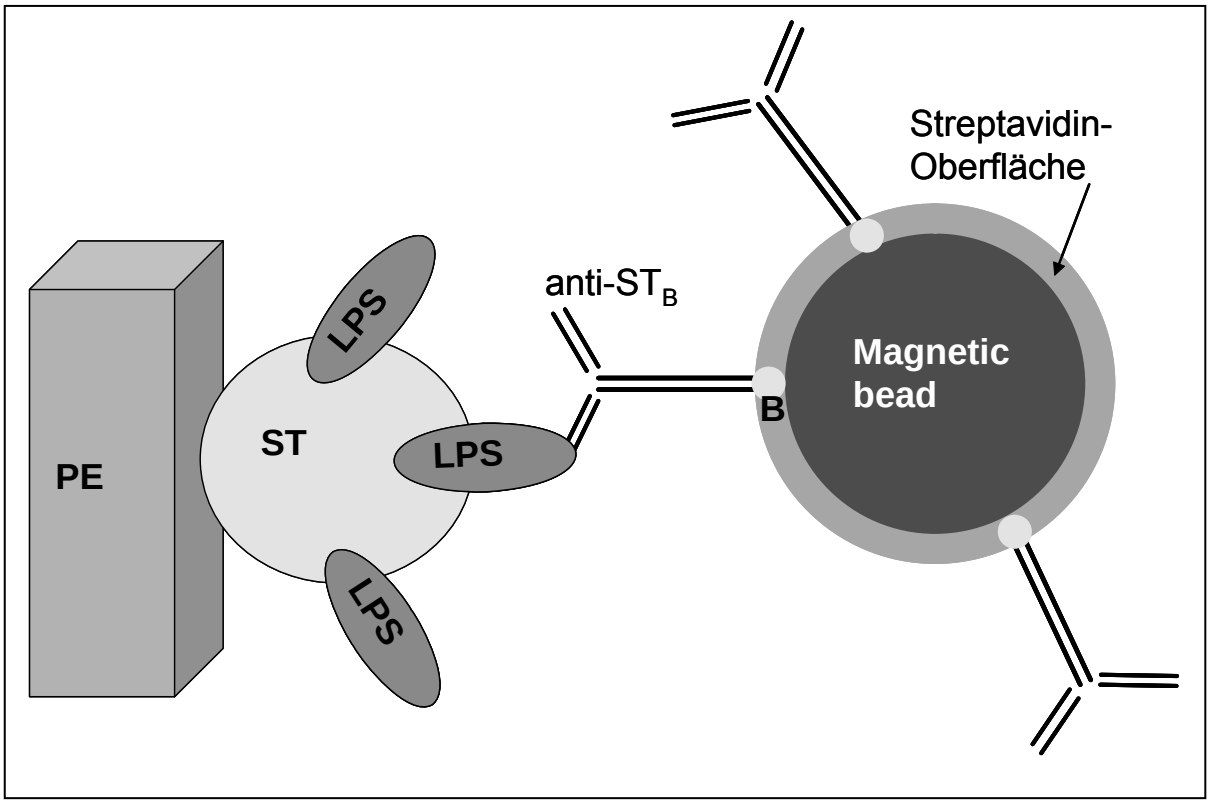


Abbildung 128 **Schematische Darstellung der direkten Detektion von *S. typhimurium* mit Antikörper.** E = Polyethylensinterkörper, ST = *S. typhimurium*-Zelle, LPS = Lipopolysaccharid enthalten in der *S. typhimurium*-Zelle, anti-STB = biotinylierter Antikörper gegen *S. typhimurium* LPS, B = Biotinfunktion.

In einem ersten Schritt wurde die optimale Konzentration an anti-ST_B Detektionsantikörper bestimmt. Hierzu wurden jeweils 10^7 cfu/ml *S. typhimurium* mit Immobilisierungspuffer an die PE-Sinterkörper immobilisiert. Die Magnetic Beads wurden filtriert verwendet, die Menge an Detektionsantikörper wurde variiert. Detektionsantikörper und Magnetic Beads wurden in 0,15 M PBS-Messpuffer pH 7,3 mit 10 % (v/v) Caseinpuffer eingesetzt.

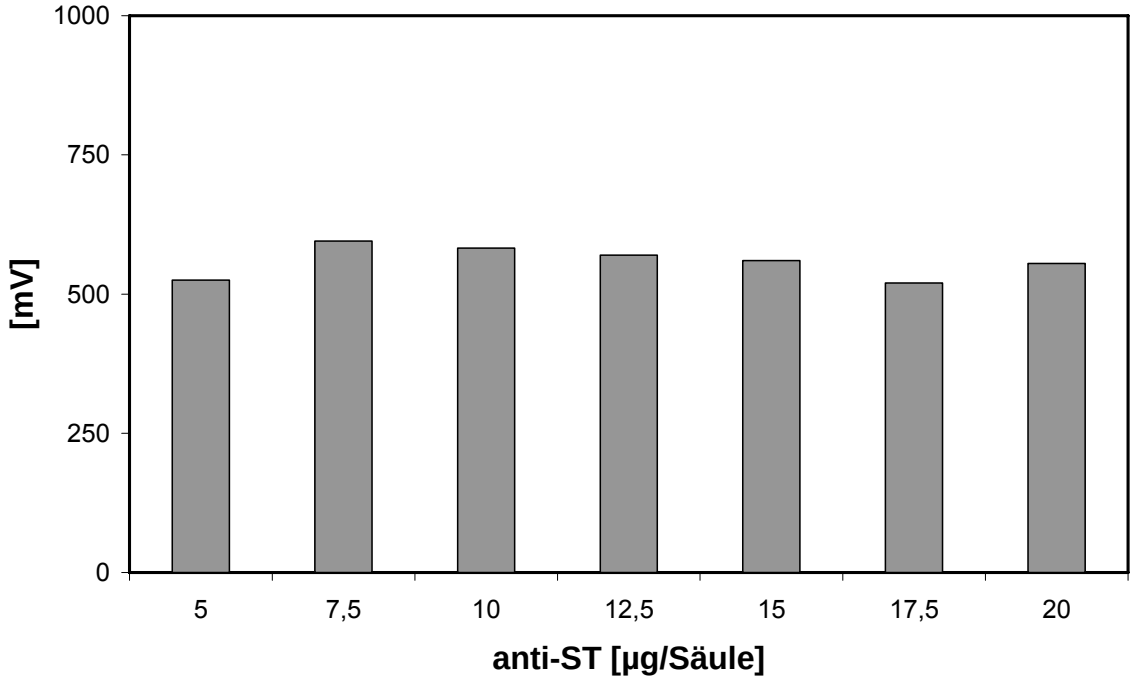


Abbildung 129 **Optimale Konzentration des anti-STB Detektionsantikörpers nach Kopplung an die Magnetic Beads.** (n=2)

In Abb. 129 ist kein großer Einfluss der Detektionsantikörperkonzentration auf die Messung erkennbar. Die Konzentration mit dem höchsten Signal bzw. 7,5 µg anti-STB pro ABICAP®-Säule wurde für die weiteren Messungen beibehalten.

Aufbauend auf diesen Optimierungsschritt wurde eine Kalibrationsreihe für die direkte Detektion von *S. typhimurium*-Zellen mit Antikörpern erstellt. Als Probenmatrix wurde Immobilisierungspuffer pH 9,5 verwendet. Die Durchführung des Assays erfolgte in Messpuffer pH 7,3.

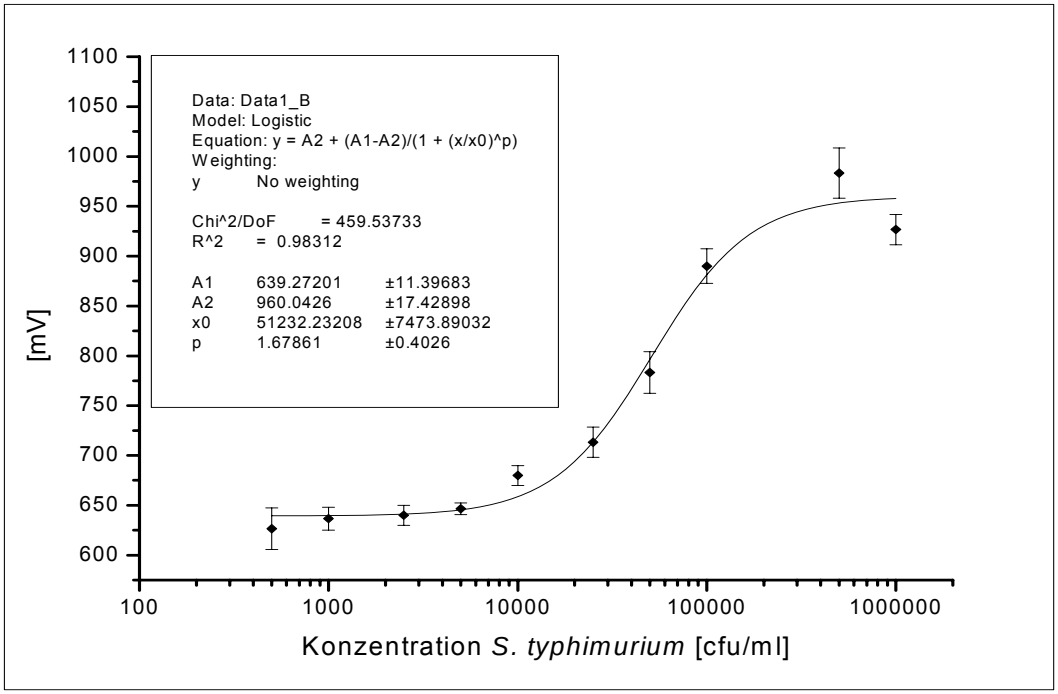


Abbildung 130 **Kalibrationsreihe der direkten Detektion mit Antikörpern.** Der Blindwert (0 cfu/ml) betrug 550 mV.

Folgender linearer Messbereich konnte bestimmt werden.

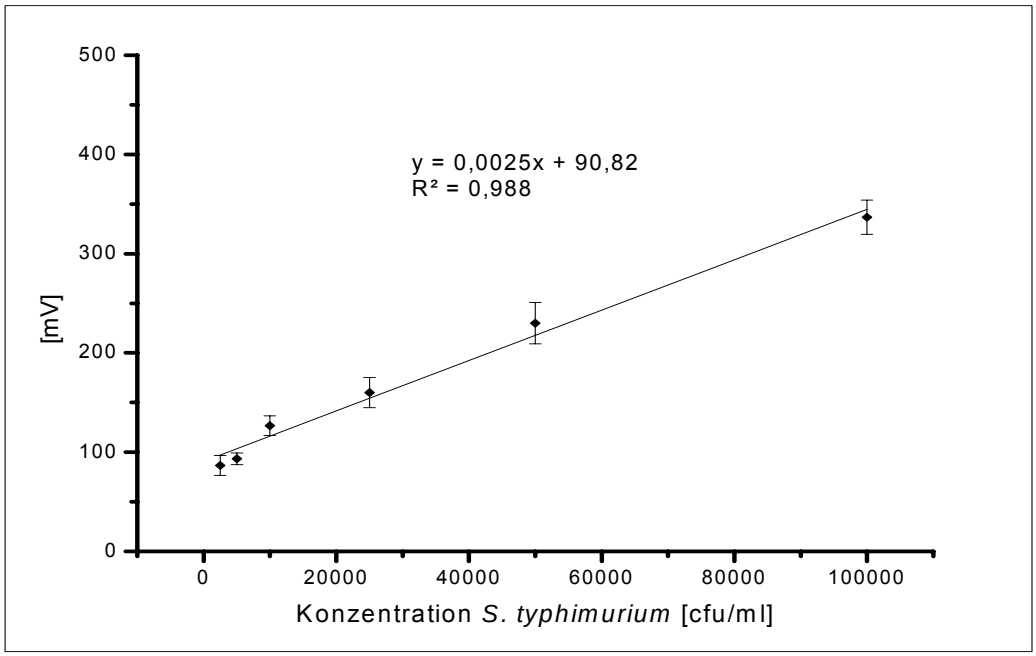


Abbildung 131 Linearer Messbereich der direkten Detektion mit Antikörpern bei pH 9,5.

Die Kalibrationsreihe zeigte einen linearen Messbereich von $2{,}5x10^3$- $5x10^5$ cfu/ml *S. typhimurium.* Die Linearität der Ausgleichsgeraden ist mit 0,988 nicht besonders gut. Außerdem erkennt man im niedrigen Konzentrationsbereich deutlich überlappende Fehlerbalken. Zur Bestimmung der Standardabweichung des Detektionssystems wurde ein Intra-Assay durchgeführt. Hierfür wurden die Konzentration 0 cfu/ml (Blindwert), 2,5 x 10^4 cfu/ml, 10^5 cfu/ml und 10^6 cfu/ml *S. typhimurium* jeweils 6-mal vermessen.

Tabelle 32 Intra-Assay des *S. typhimurium*-Assays in direkter Detektion mit Antikörpern.

Konzentration *S. typhimurium*	Standardabweichung [%]
0 cfu/ml	6,9 %
2,5 x 10^4 cfu/ml	4,9 %
10^5 cfu/ml	4,4 %
10^6 cfu/ml	2,8 %
Gesamt	**4,6 %**

Der durchschnittliche Variationskoeffizient von 4,6 % ist für diesen Test sehr gut. Man bemerkt wieder eine erhöhte Variation des Blindwertes, insgesamt sind die bestimmten Werte aber sehr ähnlich.

3.9.2.2 Direkte Detektion mit Antikörper (pH 5,0)

Analog zu Kap. 3.9.2.1 wurde ebenfalls die direkte Detektion von *S. typhimurium* mit dem polyklonalem anti-ST Antikörper getestet. Der Versuchsaufbau und das Detektionsprinzip sind bis auf eine Beschichtung des PE-Sinterkörpers mit Silan identisch.

Wie in Kap. 3.9.2.1 wurde als erster Schritt die optimale Konzentration an anti-ST_B Detektionsantikörper in Verbindung mit den Magnetic Beads bestimmt. Hierzu wurden jeweils 10^7 cfu/ml *S. typhimurium* mit Immobilisierungspuffer (0,1 M Citrat-Puffer pH 5,0) an die PE-Sinterkörper immobilisiert. Die Magnetic Beads wurden filtriert verwendet, die Menge an Detektionsantikörper wurde variiert. Detektionsantikörper und Magnetic Beads wurden in 0,15 M PBS-Messpuffer pH 7,3 mit 10 % (v/v) Caseinpuffer eingesetzt.

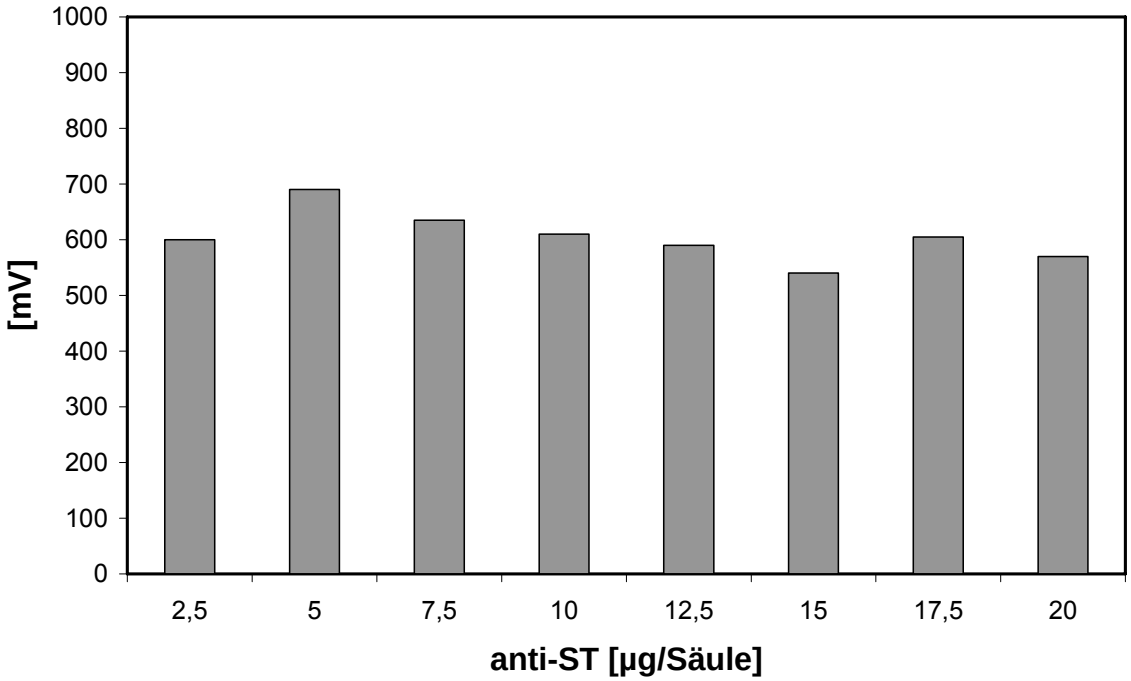


Abbildung 132 **Optimale Konzentration des anti-STB Detektionsantikörpers nach Kopplung an die Magnetic Beads.** (n=2)

Man erkennt eine optimale Antikörperkonzentration von 5 µg anti-ST_B pro Säule. Höhere Antikörperkonzentrationen führen anscheinend zu einer Abnahme des Messsignals. Die ermittelte, optimale Konzentration von 5 µg pro Detektionssäule wurde nachfolgend verwendet.

Nach diesem Optimierungsschritt wurde eine Kalibrationsreihe für die direkte Detektion von *S. typhimurium*-Zellen mit Antikörpern bei pH 5,0 erstellt. Als Probenmatrix wurde der Immobilisierungspuffer bei pH 5,0 verwendet. Die Durchführung des Assays erfolgte in Messpuffer pH 7,3.

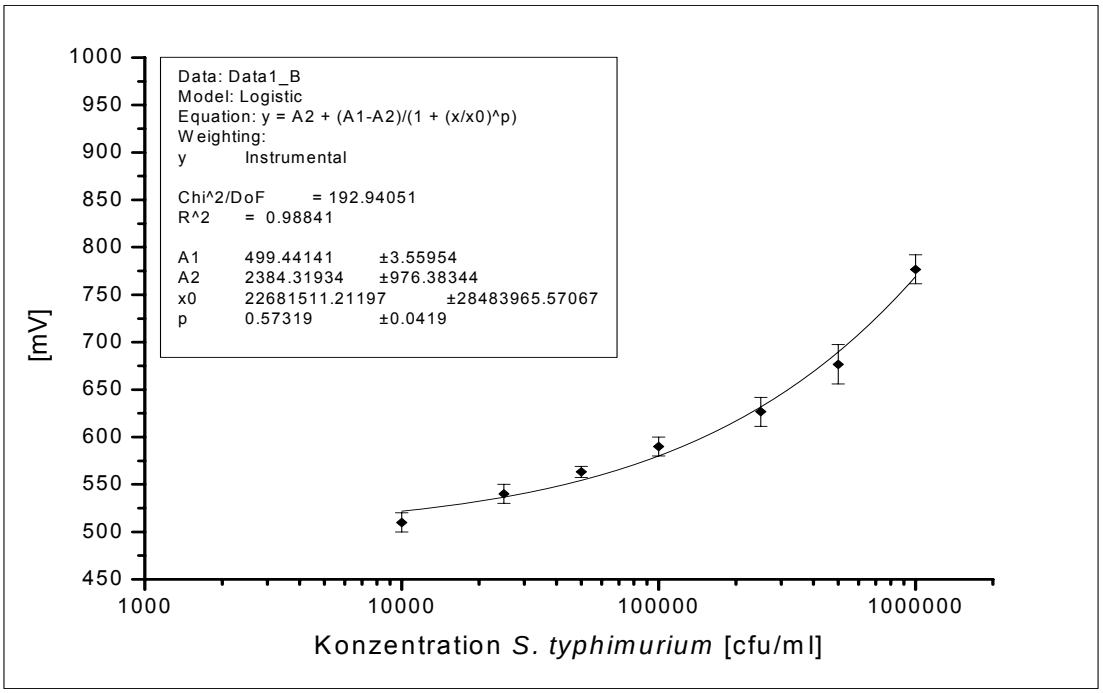


Abbildung 133 **Kalibrationsreihe der direkten Detektion mit Antikörpern bei pH 5,0.**
Der Blindwert (0 cfu/ml) betrug 410 mV.

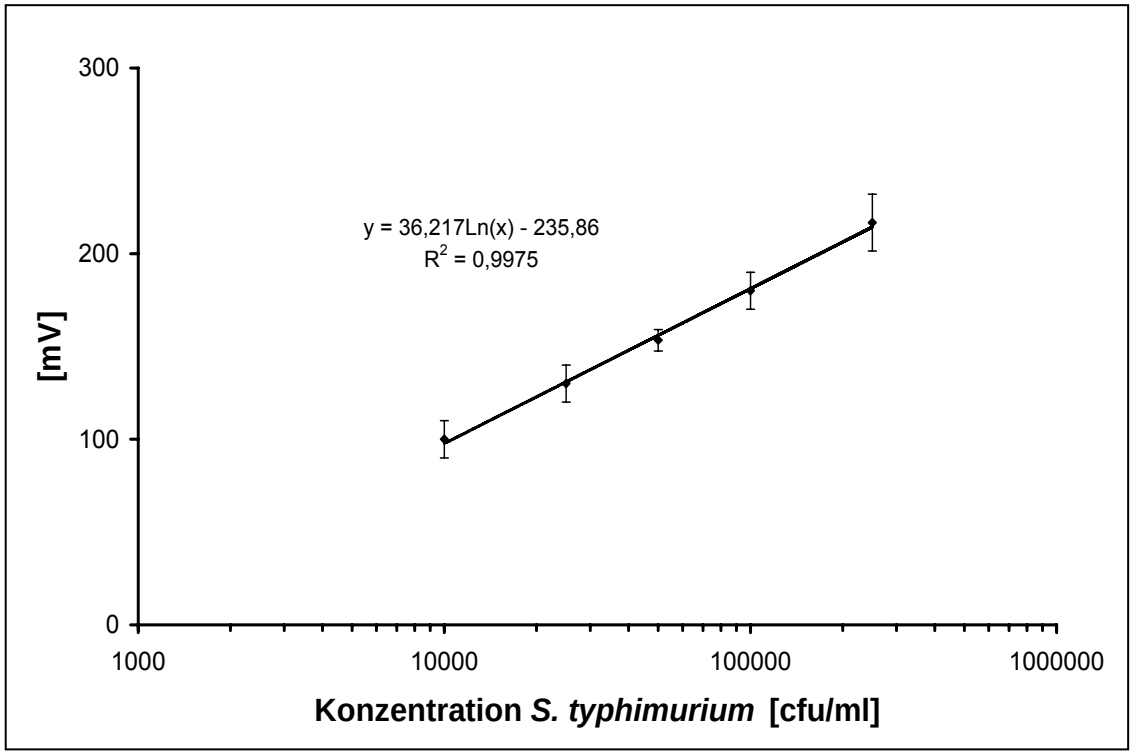


Abbildung 134 **Logarithmischer Messbereich der direkten Detektion mit Antikörpern bei pH 5,0.**

Die Kalibrationsreihe zeigte einen Messbereich von $1x10^4$- $2,5x10^5$ cfu/ml *S. typhimurium.* Die Linearität der Ausgleichsgeraden ist mit 0,9975 sehr gut. Allerdings ist der Messbereich sehr eng. Weiterhin wurde ein logarhytmischer Messbereich festgestellt. Zur Bestimmung der Standardabweichung des Detektionssystems wurde ein Intra-Assay durchgeführt. Hierfür wurden die Konzentration 0 cfu/ml (Blindwert), 10^4 cfu/ml, 10^5 cfu/ml und 10^6 cfu/ml *S. typhimurium* jeweils 6-mal vermessen.

Tabelle 33 Intra-Assay des *S. typhimurium*-Assays in direkter Detektion (pH 5,0) mit Antikörpern.

Konzentration *S. typhimurium*	Standardabweichung [%]
0 cfu/ml	7,1 %
10^4 cfu/ml	4,3 %
10^5 cfu/ml	6,3 %
10^6 cfu/ml	5,8 %
Gesamt	**5,9 %**

Insgesamt sind diese Standardabweichungen höher als bei der direkten Detektion bei pH 9,5, aber immer noch akzeptabel. Man erkennt wiederum eine erhöhte Standardabweichung des Blindwertes bei insgesamt sehr konstanten Werten.

3.9.2.3 Direkte Detektion mit TSP

Die direkte Detektion von *S. typhimurium*-Zellen ermöglicht nun auch die biosensorische Anwendung des TSP mit Magnetic Beads. Die Durchführung des Assays erfolgte analog zu Kap. 3.9.2.1. Das TSP wurde biotinyliert eingesetzt, dies ermöglichte die Kopplung des Detektionsmoleküls an die Magnetic Beads.

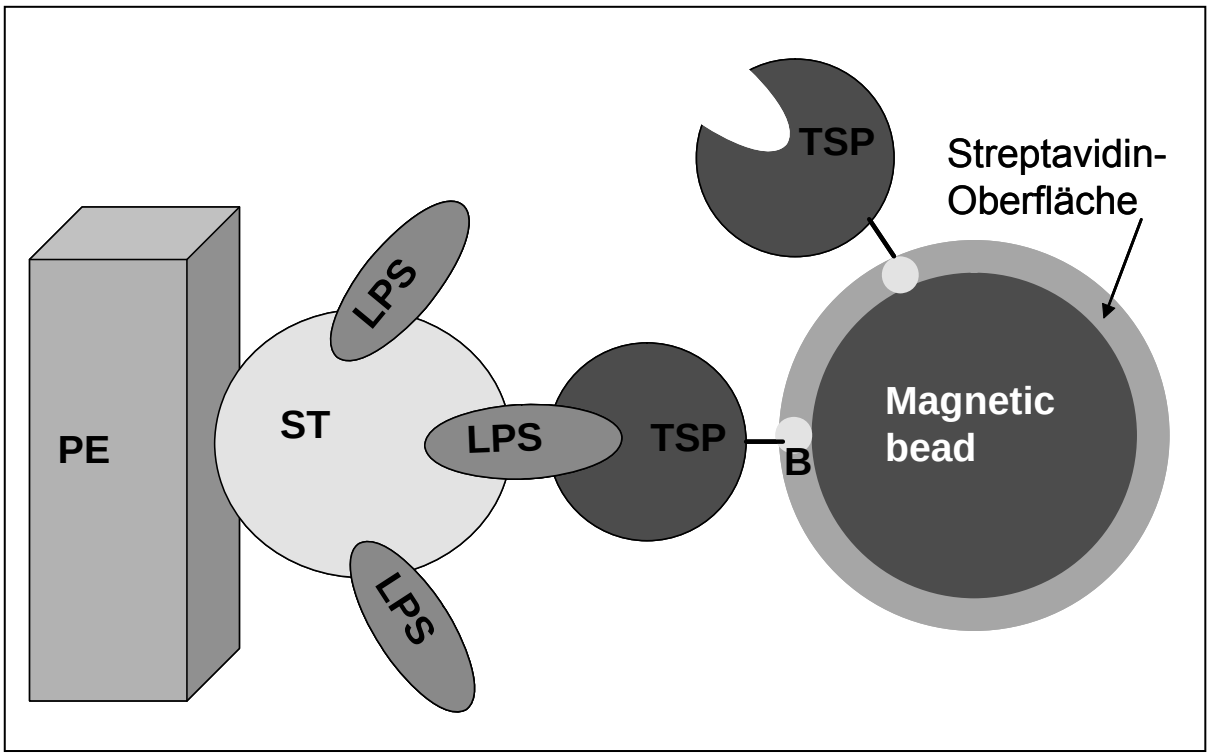


Abbildung 135 **Schematische Darstellung der direkten Detektion von *S. typhimurium* mit Antikörper.** E = Polyethylensinterkörper, ST = *S. typhimurium*-Zelle, LPS = Lipopolysaccharid enthalten in der *S. typhimurium*-Zelle, TSP = P22 tail spike Protein gegen *S. typhimurium* LPS, B = Biotinfunktion.

Zur Optimierung des Detektionssystems mit TSP wurde zuerst die optimale Konzentration des biotinylerten TSP_B zur Kopplung an die Magnetic Beads bestimmt. Hierfür wurden 10^6 cfu/ml *S. typhimurium* in Immobilisierungspuffer pH 9,5 an die PE-Sinterkörper immobilisiert. Nach Blockierung verbliebender freier Bindungsstellen mit 10 % (v/v) Caseinpuffer in Messpuffer pH 7,3 wurde das TSP-Magnetic Bead Konjugat mit variierenden TSP_B-Konzentrationen in Messpuffer pH 7,3 mit 10 % Caseinpuffer (v/v) über die Säule gegeben und für ca. 30 Minuten inkubiert. Abschließend erfolgte ein Spülschritt mit Messpuffer pH 7,3 und das Vermessen der Säule.

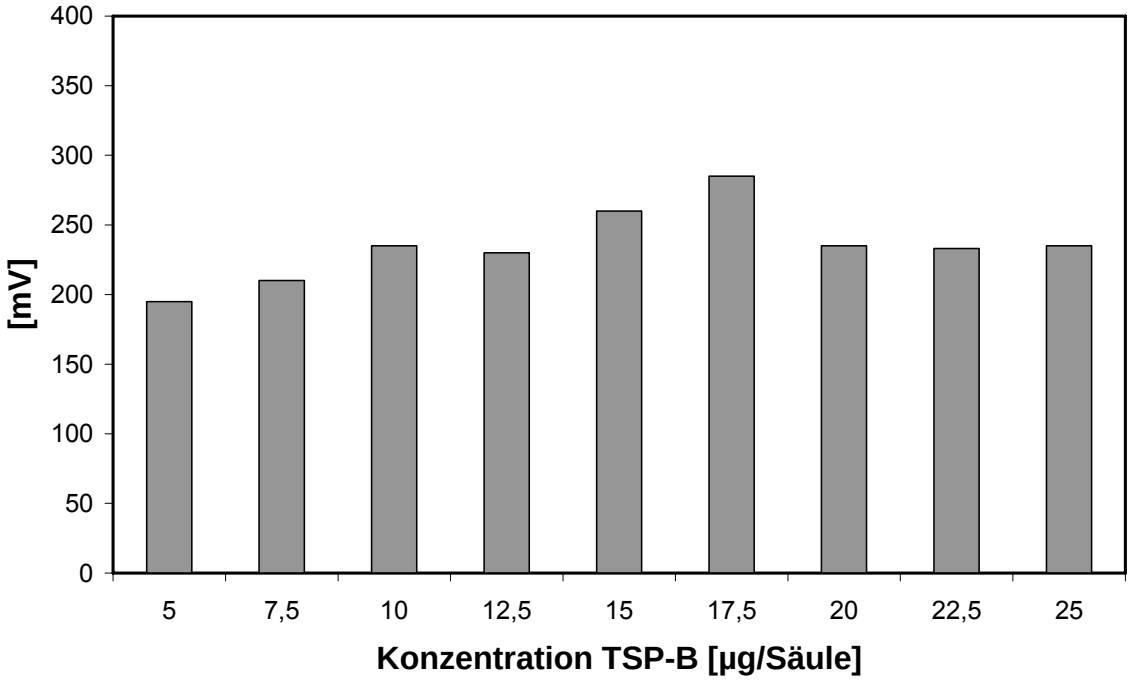


Abbildung 136 **Optimale Konzentration des TSP_B Detektionsmoleküls nach Kopplung an die Magnetic Beads.** (n=2)

Man erkennt eine optimale TSP_B-Konzentration von 17,5 µg pro ABICAP®-Säule.

Anschließend an diese Optimierungsschritte erfolgte die Bestimmung einer Kalibrationsreihe für die direkte Detektion von *S. typhimurium*-Zellen mit TSP. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen von *S. typhimurium* in Immobilisierungs- bzw. Probenpuffer (0,1 M Carbonat-Puffer pH 9,5) verdünnt und über die Säule gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen mit 10 % (v/v) Caseinpuffer in Messpuffer und die Zugabe der Magnetic Bead-TSP-Konjugate in demselben Puffer.

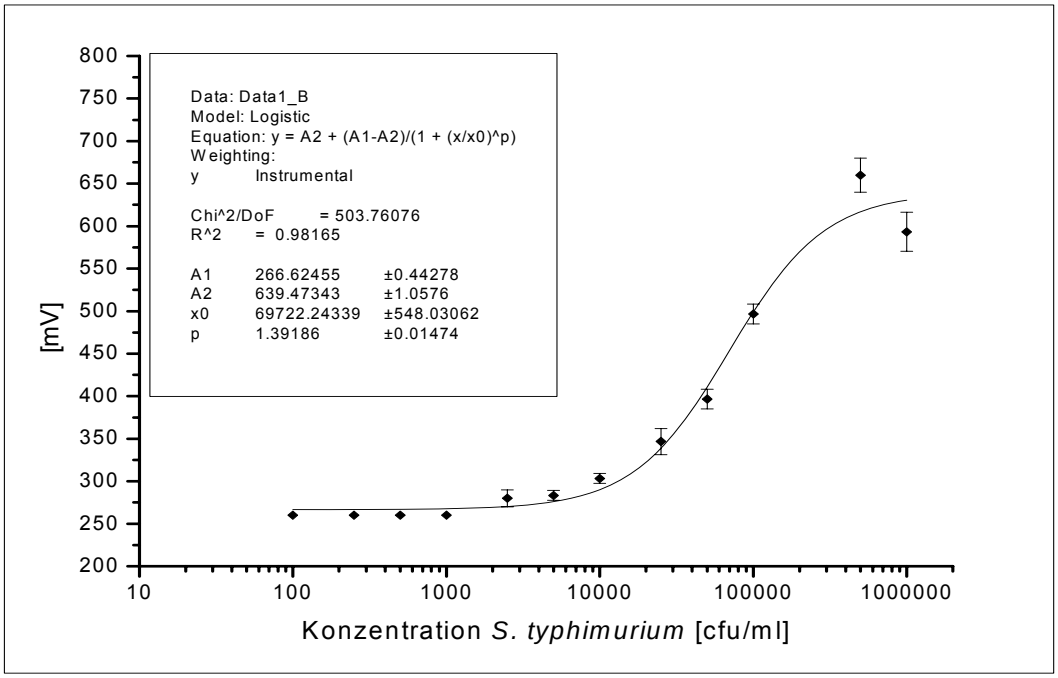


Abbildung 137 Kalibrationsreihe der direkten Detektion mit TSP. Der Blindwert (0 cfu/ml) betrug 235 mV.

Erst ab 2500 cfu/ml konnte ein Anstieg des Signals detektiert werden. Folgender linearer Messbereich wurde abgeleitet.

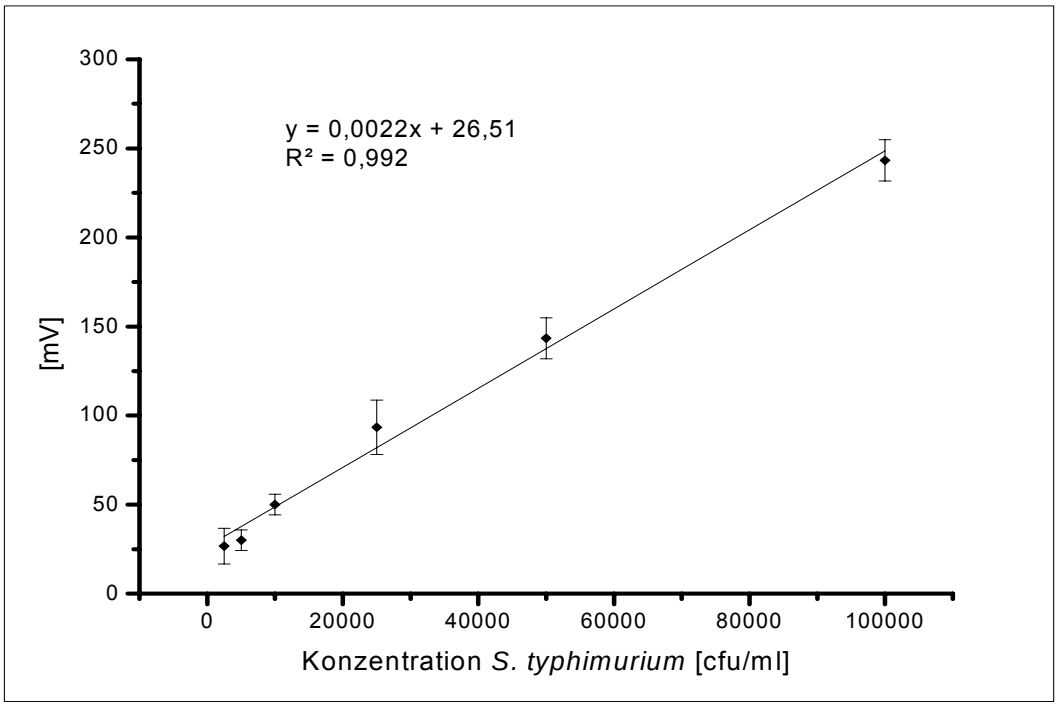


Abbildung 138 Linearer Messbereich der Kalibrationsreihe der direkten Detektion mit TSP.

Der lineare Messbereich dieser Kalibration betrug 2,5x10^3 cfu/ml bis 10^5 cfu/ml *S. typhimurium.* Die Linearität der Ausgleichsgeraden ist mit 0,992 deutlich besser als die Ausgleichsgerade der direkten Detektion mit Antikörpern aus Abb. 131 (0,988). Zur genaueren Bestimmung der Standardabweichungen wurde auch für dieses Detektionsprinzip ein Intra-Assay gemessen. Hierfür wurden die Konzentrationen 0 cfu/ml (Blindwert), 2,5 x 10^4 cfu/ml, 10^5 cfu/ml und 10^6 cfu/ml *S. typhimurium* jeweils 6-mal vermessen.

Tabelle 34 Intra-Assay des *S. typhimurium*-Assays in direkter Detektion mit TSP.

Konzentration *S. typhimurium*	Standardabweichung [%]
0 cfu/ml	10,2 %
2,5 x 10^4 cfu/ml	2,4 %
10^5 cfu/ml	3,0 %
10^6 cfu/ml	3,9 %
Gesamt	**4,9 %**

Der durchschnittliche Variationskoeffizient ist mit 4,9 % sehr gut und vergleichbar zur direkten Detektion mit Antikörpern. Auffällig ist der abweichend hohe Variationskoeffizient des Blindwertes.

Insgesamt konnte eine direkte Detektion von *S. typhimurium*-Zellen mit nur einem Detektionsmolekül gezeigt werden. Die Leistungsdaten dieser Detektionssysteme unterscheiden sich nicht signifikant von Sandwich-Anordnungen.

3.9.2.4 Direkte Detektion mit TSP bei pH 5,0

Die direkte Detektion von *S. typhimurium* Zellen bei pH 5,0 mit silanisierten PE-Sinterkörpern erfolgte analog zu Kap. 3.9.2.2. Bis auf die zusätzliche Silanisierung des Sinterkörpers ist das Detektionsprinzip und der Versuchsaufbau identisch. Wie in Kap. 3.9.2.2 wurde zuerst die optimale Konzentration des biotinylierten TSP-Moleküls in Verbindung mit den Magnetic Beads ermittelt. Hierzu wurden 10^7 Partikel *S. typhimurium* pro ml in 0,1 M Citrat-Puffer pH 5,0 suspendiert und an die PE-Sinterkörper für 30 min immobilisiert. Nach Blockierung verbliebender freier Bindungsstellen mit 10 % (v/v) Caseinpuffer in Messpuffer pH 7,3 wurde das TSP-Magnetic Bead Konjugat mit variierenden TSP_B-Konzentrationen in Messpuffer pH 7,3 mit 10 % Caseinpuffer (v/v)

über die Säule gegeben und für ca. 30 Minuten inkubiert. Abschließend erfolgte ein Spülschritt mit Messpuffer pH 7,3 und das Vermessen der Säule.

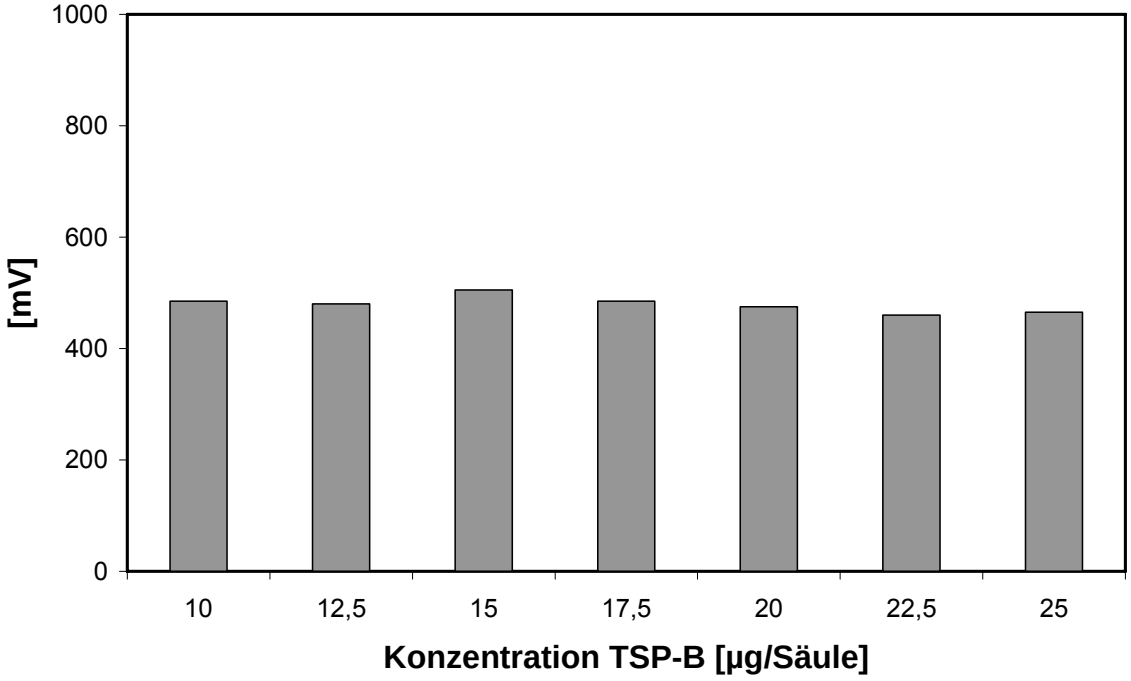


Abbildung 139 **Optimale Konzentration des TSP_B Detektionsmoleküls nach Kopplung an die Magnetic Beads.**

Man erkennt eine optimale TSP_B-Konzentration von 15 µg pro ABICAP®-Säule. Insgesamt ist das ermittelte Signal der verschiedenen TSP_B-Konzentrationen wenig konzentrationsabhängig. Der optimale Wert von 15 µg pro Säule deckt sich ungefähr mit der optimalen TSP_B-Konzentration der direkten Detektion bei pH 9,5 (17,5 µg/Säule).

Nach diesem Optimierungsschritt wurde eine Kalibrationsreihe mit verschiedenen *S. typhimurium*-Konzentrationen ermittelt. Die jeweilige Probe wurde in 0,1 M Citrat-Puffer suspendiert und für 30 min am silanisierten PE-Sinterkörper immobilisiert. Anschließend erfolgte eine Blockierung etwaiger freier Bindungsstellen mit Caseinpuffer (10 % v/v) in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 (Messpuffer). Nach weiterer 30-minütiger Inkubation wurde die Magnetic Beads-TSP_B-Lösung über die Säule gegeben. Diese wurde ebenfalls 30 Minuten inkubiert und dann die Säule mit Messpuffer gespült. Hierbei wurden folgende Signale ermittelt.

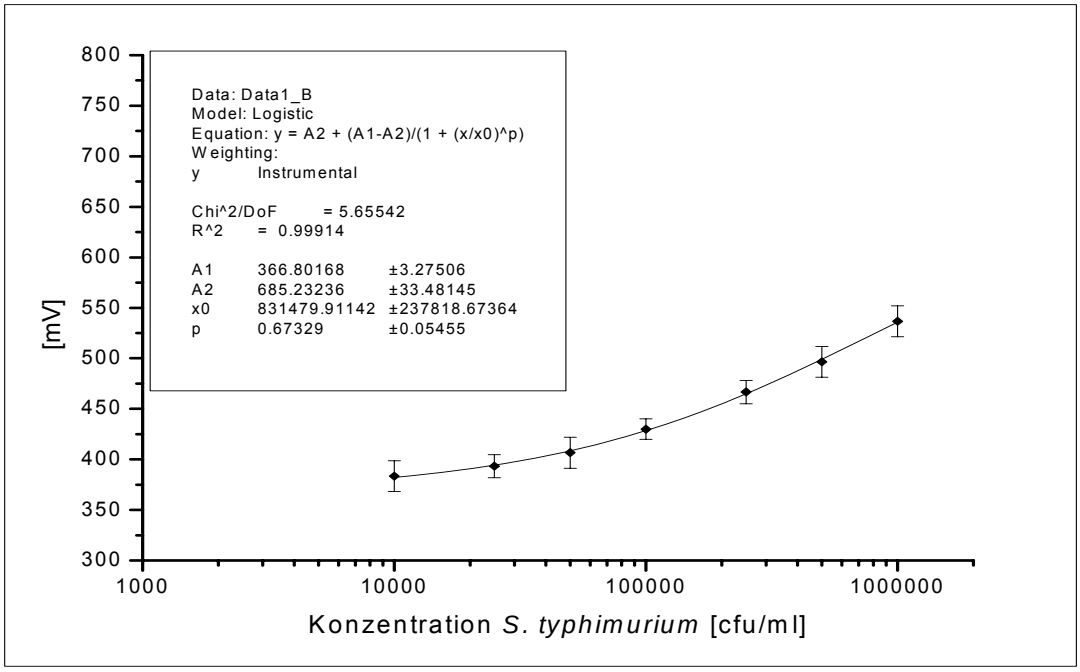


Abbildung 140 **Kalibrationsreihe der direkten Detektion mit TSP bei pH 5,0.**
Der Blindwert (0 cfu/ml) betrug 315 mV.

Folgender Messbereich konnte abgeleitet werden.

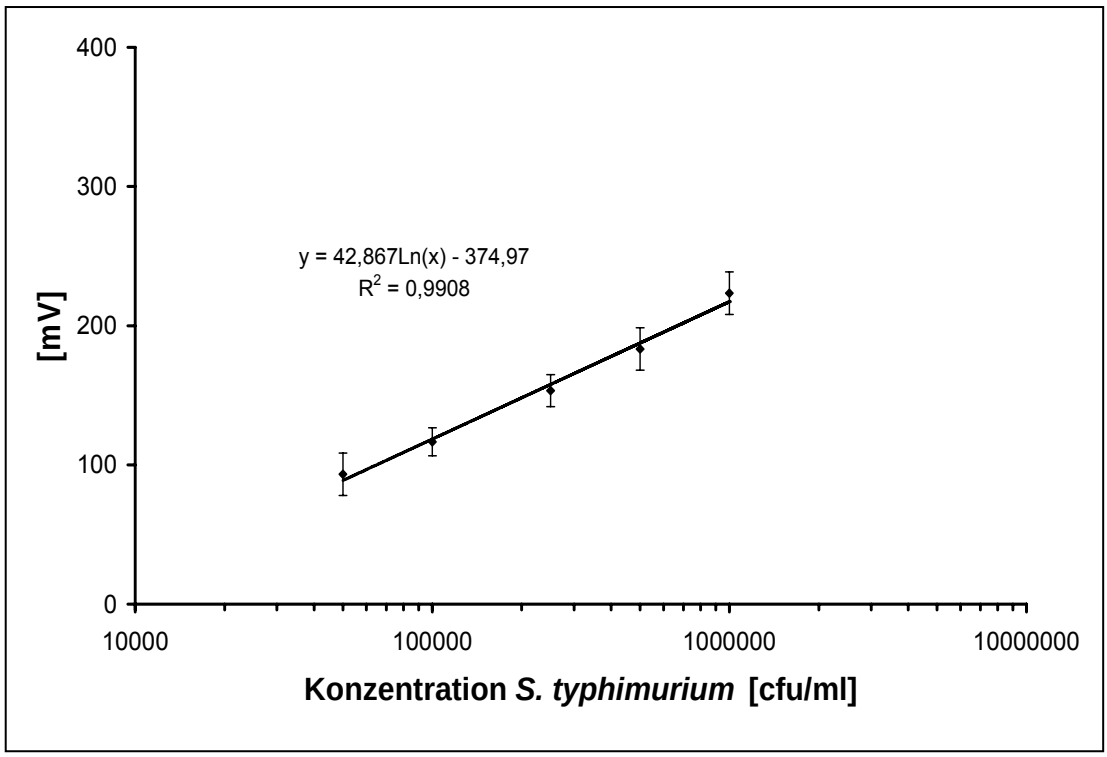


Abbildung 141 **Logarithmischer Messbereich der Kalibrationsreihe der direkten Detektion mit TSP bei pH 5,0.**

Der Messbereich dieser Kalibration betrug $5x10^4$ cfu/ml bis 10^6 cfu/ml *S. typhimurium.* Die Bestimmtheit der Ausgleichskurve ist mit 0,9908 wie bei der direkten Detektion mit TSP bei pH 9,5 sehr gut. Allerdings wurde wieder ein logarithmischer Zusammenhang festgestellt. Zur genaueren Bestimmung der Standardabweichungen wurde auch für dieses Detektionsprinzip ein Intra-Assay gemessen. Hierfür wurden die Konzentrationen 0 cfu/ml (Blindwert), 10^4 cfu/ml, 10^5 cfu/ml und 10^6 cfu/ml *S. typhimurium* jeweils 6-mal vermessen.

Tabelle 35 Intra-Assay des *S. typhimurium*-Assays in direkter Detektion mit TSP bei pH 5,0.

Konzentration *S. typhimurium*	Standardabweichung [%]
0 cfu/ml	13,2%
10^4 cfu/ml	17,0 %
10^5 cfu/ml	8,5 %
10^6 cfu/ml	5,0 %
Gesamt	**10,9%**

Auffällig ist die hohe Standardabweichung des Blindwertes und der niedrigen Probenkonzentration. Dies kann auch anhand der Kalibrationsreihe nicht nachvollzogen werden. Insgesamt ist der Variationskoeffizient mit 10,9 % für einen immunodiagnostischen Test zu hoch.

Die Nutzung der direkten Detektion bei pH 5,0 mit silanisierten PE-Sinterkörpern zeigte abweichend zur direkten Detektion bei pH 9,5 und unbehandelten PE-Sinterkörpern jeweils logarithmische Konzentrationsabhängigkeiten und deutlich engere kalibrierfähige Messbereiche. Auch die Standardabweichungen waren insgesamt höher.

3.9.3 Direkte Detektion mit einem kompetitiven Assay

Nach den positiven Ergebnissen der direkten Detektion aus Kap. 3.9.2 bot sich eine Übertragung des kompetitiven Messprinzips aus Kap. 3.8 von der SPR- auf die Magnetic Bead-Plattform an. Hierbei wurde sowohl mit dem bekannten anti-ST Antikörper als auch mit dem TSP experimentiert. Nach negativen Vorversuchen mit dem TSP als Detektionsmolekül musste der Einsatz dieses Moleküls verworfen werden. Obwohl auf der SPR-Plattform eine Detektion definitiv möglich war, kam es zu sterischen Problemen beim

Einsatz des TSP an den PE-Sinterkörpern. Eine Detektion von *S. typhimurium* LPS war mit TSP nicht möglich.
Um trotzdem eine Anwendbarkeit des kompetitiven, direkten Messprinzips mit Magnetic Beads zu zeigen, wurde die Entwicklung auf den Einsatz des anti-ST Antikörpers fokussiert.

Das zugrunde liegende Messprinzip ist analog zu Kap. 3.8. Es wird eine hydrophobe C18-Alkyloberfläche auf den PE-Sinterkörpern erzeugt und über hydrophobe Wechselwirkungen das *S. typhimurium* LPS daran immobilisiert. Nach Blockierung freier Bindungsstellen mit 10 % Caseinpuffer (v/v) in 0,15 M PBS-Messpuffer pH 7,3 wurde die vorinkubierte Probenlösung über die Säule gegeben. Die Probenlösung enthielt den zu detektierenden Analyten LPS und das anti-ST_B-Magnetic Bead-Konjugat, verdünnt in Messpuffer mit 10 % (v/v) Caseinpuffer. Diese Probe wurde für 30 Minuten inkubiert. Prinzipiell sollte nun freier anti-ST_B-Antikörper mit Magnetic Beads an das auf der PE-Oberfläche immobilisierte LPS ankoppeln. Je mehr zu detektierendes LPS in der Probe vorhanden ist, desto mehr anti-ST_B-Antikörper sind bereits in der Lösung abgesättigt und können nicht mehr an die Oberfläche der Säule binden. Abbildung 142 zeigt eine schematische Darstellung des Messprinzips.

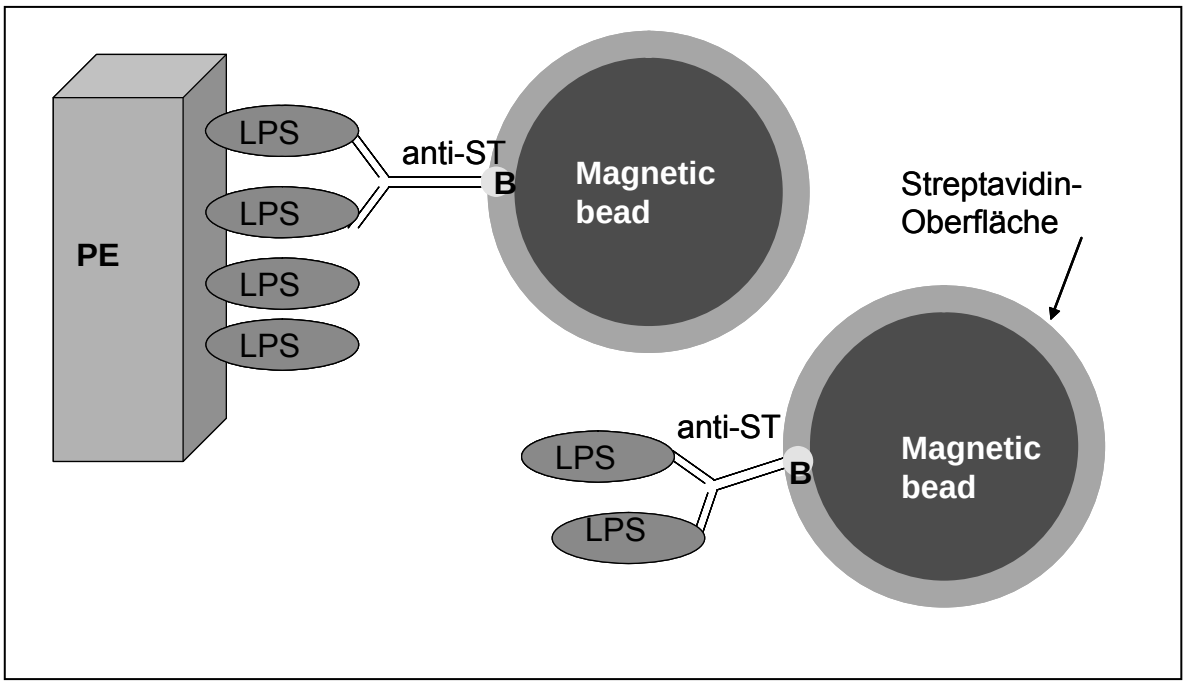


Abbildung 142 **Schematische Darstellung des kompetitiven Detektionsprinzips mit Magnetic Beads und Antikörper.** PE = Polyethylen-Sinterkörper, LPS = *S. typhimurium* Lipopolysaccharid, anti-ST = Antikörper, B = Biotinfunktion.

In einem ersten Schritt wurde die Immobilisierung des *S. typhimurium* LPS über hydrophobe Wechselwirkung an die alkylierte C18-Oberfläche des PE-Sinterkörpers untersucht. Hierzu wurde das LPS in PBS-Puffer pH 7,3 und den Carbonat-Puffern pH 8,5 und 9,5 immobilisiert. Alle Puffer waren 0,1 M. Die Inkubationszeit auf der Säule betrug jeweils 30 Minuten. Die Ergebnisse der Immobilisierung wurden über die Durchführung des beschriebenen Assays untersucht. Es wurde kein zu detektierendes LPS in der Probe eingesetzt, bei den dargestellten Messwerten handelt es sich also um die Blindwerte ohne Proben-LPS. Als Konzentration des biotinylierten Detektionsantikörpers anti-ST_B wurde für diesen Vorversuch 10 µg pro Säule eingesetzt. Die gesamte Assay-Durchführung erfolgte in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 (Messpuffer).

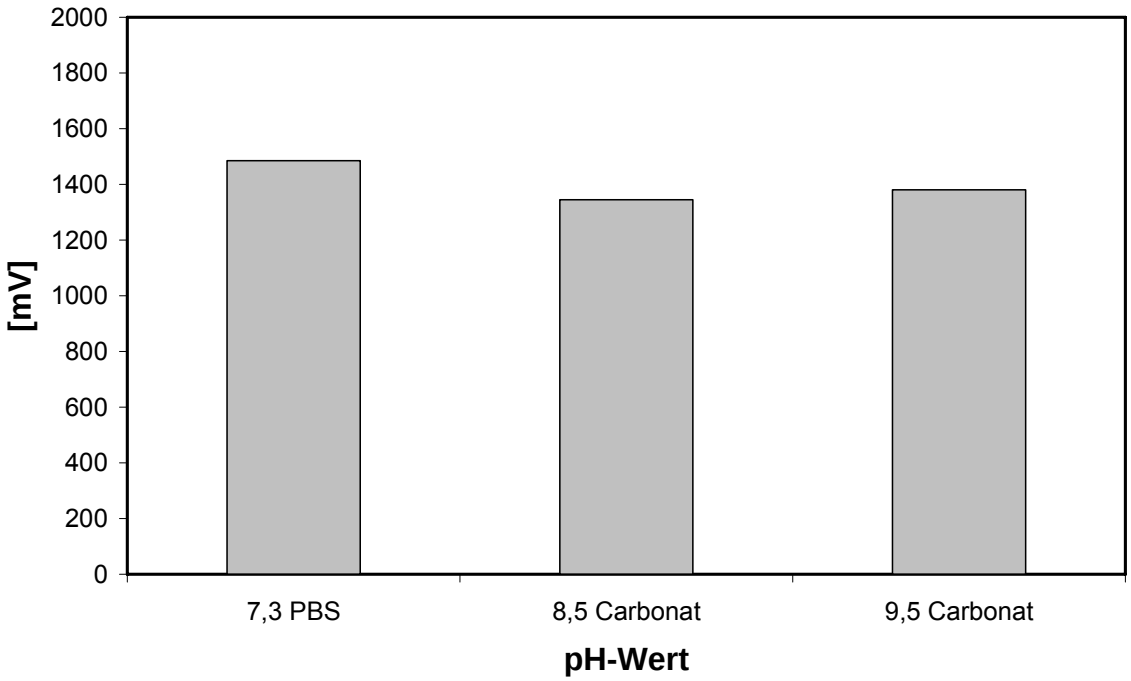


Abbildung 143 **Variation der pH-Werte zur Immobilisierung des *S. typhimurium* LPS an der Oberfläche des PE-Sinterkörpers.** Alle Puffer waren 0,1 M. PBS = PBS-Puffer, Carbonat = Carbonat-Puffer, (n=2).

Die Immobilisierungsausbeuten sind bei allen drei Puffern ähnlich zufriedenstellend. Da der höchste Messwert bei einem PBS-Puffer pH 7,3 bestimmt wurde, erfolgten alle weiteren Immobilisierungen des LPS an die alkylierte Oberflächge des PE-Sinterkörpers mit diesem Puffer.

Als weitere Einflussgröße für diesen Assay wurde die optimale Konzentration des biotinylierten Detektionsantikörpers zur Kopplung an die Magnetic Beads analysiert.

Hierbei wurde der Assay wie oben beschrieben durchgeführt. Es handelt sich um die Bestimmung des Blindwertes ohne Zugabe von Proben-LPS. Die Konzentration des anti-ST_B Antikörpers wurde variiert.

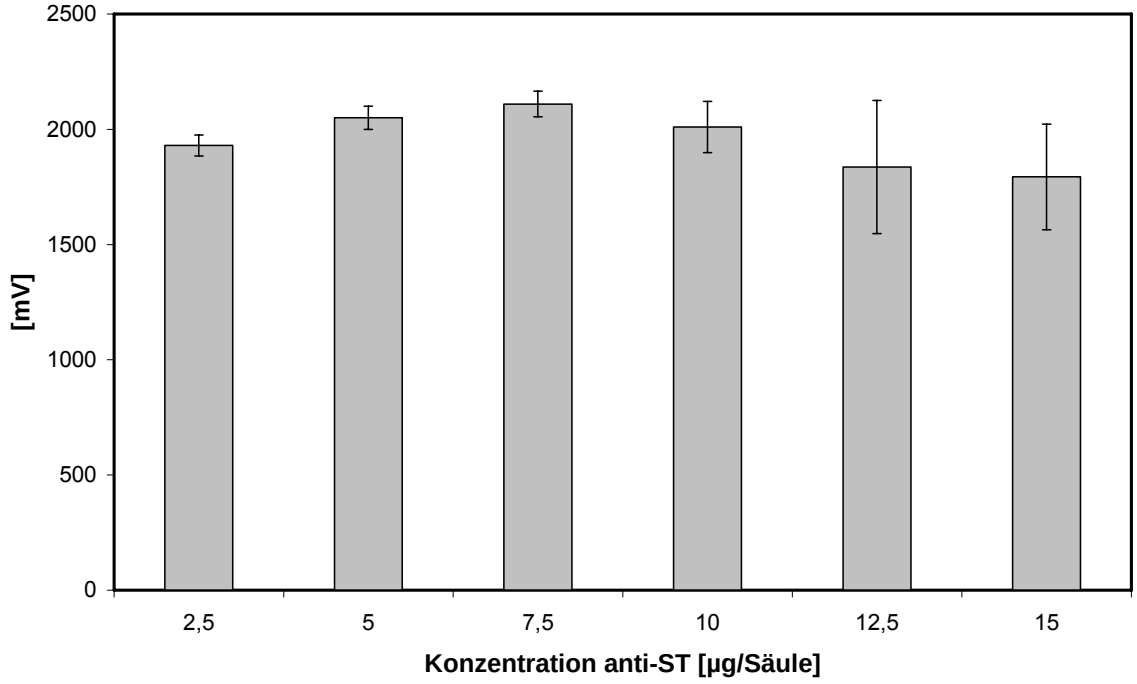


Abbildung 144 Variation der Konzentration des Detektionsantikörpers anti-ST_B. (n=3)

Bei dieser Optimierung stellte sich eine Konzentration von 7,5 µg anti-ST_B pro Säule als am Besten heraus. Mit dieser Konzentration wurden alle weiteren Arbeiten durchgeführt.

3.9.3.1 Detektion in Puffer

Weiterhin wurde eine Kalibrationsreihe des Systems zur Detektion von *S. typhimurium* LPS in Puffer bestimmt. Die zu detektierende Menge LPS wurde in den Messpuffer mit 10 % (v/v) Caseinpuffer dotiert und die Antikörper-Magnetic Bead-Konjugate darin für 30 Minuten inkubiert. Das Probenvolumen betrug 500 µl. Anschließend wurde die gesamte Probe über die Säule gegeben und nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit mit Messpuffer gespült.

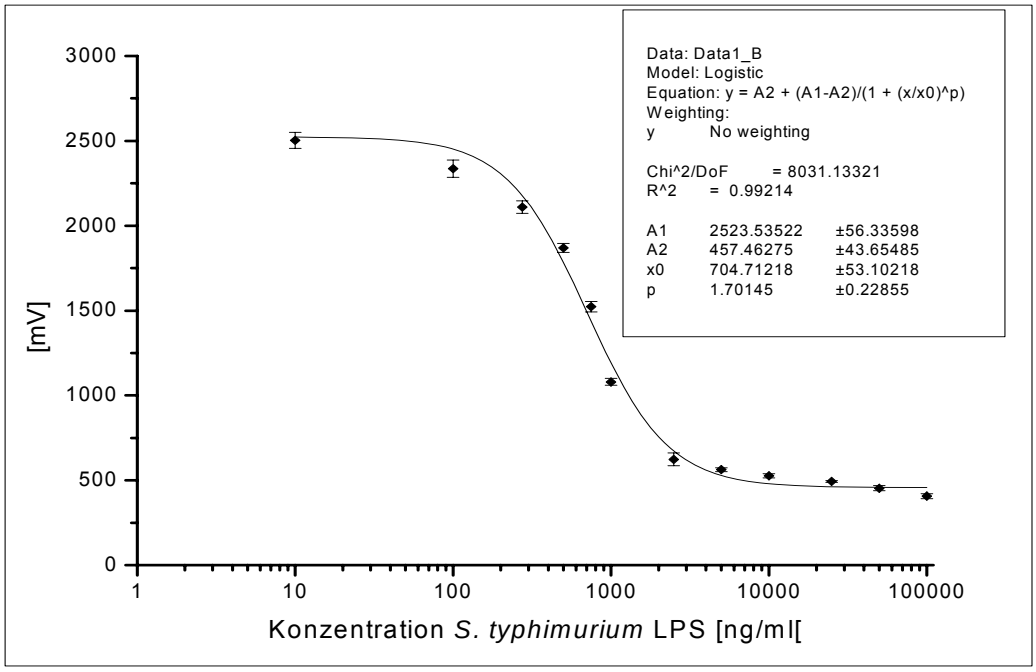


Abbildung 145 **Kalibrationsreihe der kompetitiven Detektion von *S. typhimurium* LPS mit Magnetic Beads in Puffer.** Der Blindwert (0 ng LPS/ml) betrug 2650 mV.

Aus dieser Kalibrationsreihe wurde folgender linearer Messbereich abgeleitet.

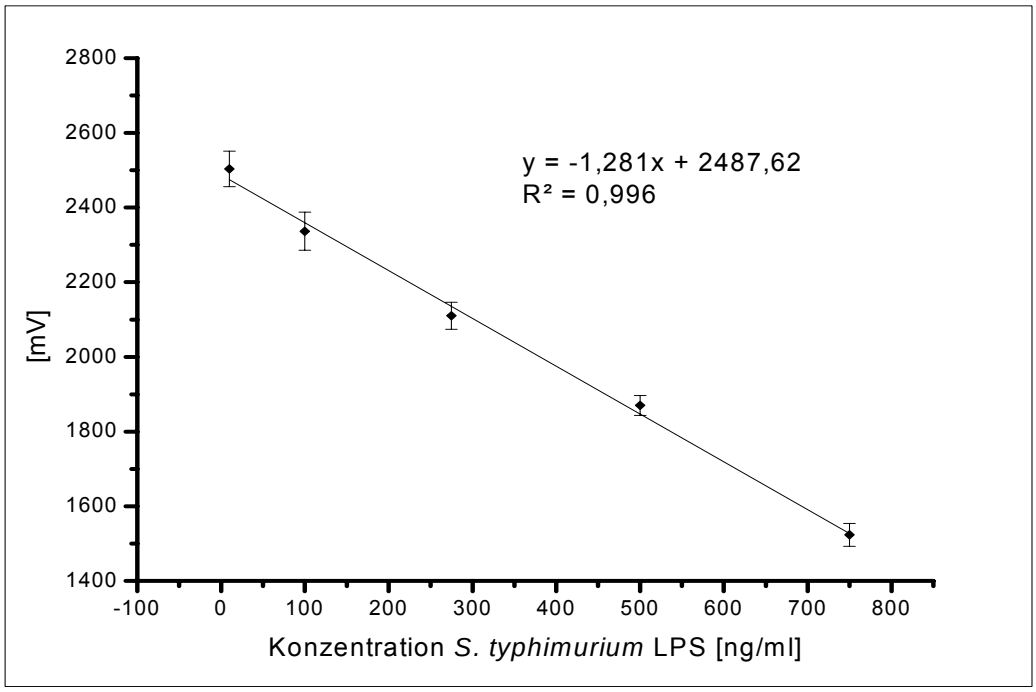


Abbildung 146 **Linearer Messbereich der Kalibrationsreihe der kompetitiven Detektion von *S. typhimurium* LPS mit Magnetic Beads in Puffer.**

Der lineare Messbereich dieser Kalibrationsreihe betrug 10-750 ng LPS pro ml bei einem Probenvolumen von 500 µl. Sowohl die Linearität der Ausgleichsgeraden als auch die Standardabweichungen der Einzelwerte sind sehr gut.

Zur genaueren Bestimmung der Variationskoeffizienten wurde ein Intra-Assay durchgeführt. Hierfür wurden die Konzentrationen 0 ng/ml (Blindwert), 50 ng/ml, 250 ng/ml und 1000 ng pro ml LPS jeweils 6-mal vermessen.

Tabelle 36 **Intra-Assay des kompetitiven *S. typhimurium*-Assays mit Antikörper.**

Konzentration LPS [ng/ml]	Standardabweichung [%]
0 ng/ml	2,5 %
50 ng/ml	2,9 %
250 ng/ml	4,0 %
1000 ng/ml	3,7 %
Gesamt	**3,3 %**

Die ermittelten Variationskoeffizienten sind mit durchschnittlich 2,9 % sehr gut. Durch die kompetitive Messanordnung hat jetzt der höchste Messwert (0 ng/ml) die geringste Standardabweichung.

3.9.3.2 Detektion in Realmatrix

Als mögliche Realmatrix wurde die Kalibrierfähigkeit des kompetitiven Messsystems in Chicken Carcass Wash Water (CCWW) untersucht. Der Assay wurde wie in Kap. 3.9.3.1 mit Puffer durchgeführt, nur der Probenpuffer durch CCWW ersetzt. Zu detektierendes LPS wurde dotiert. Das verwendete CCWW war frei von *Salmonella*-Kontaminationen. Das Probenvolumen betrug 500 µl.

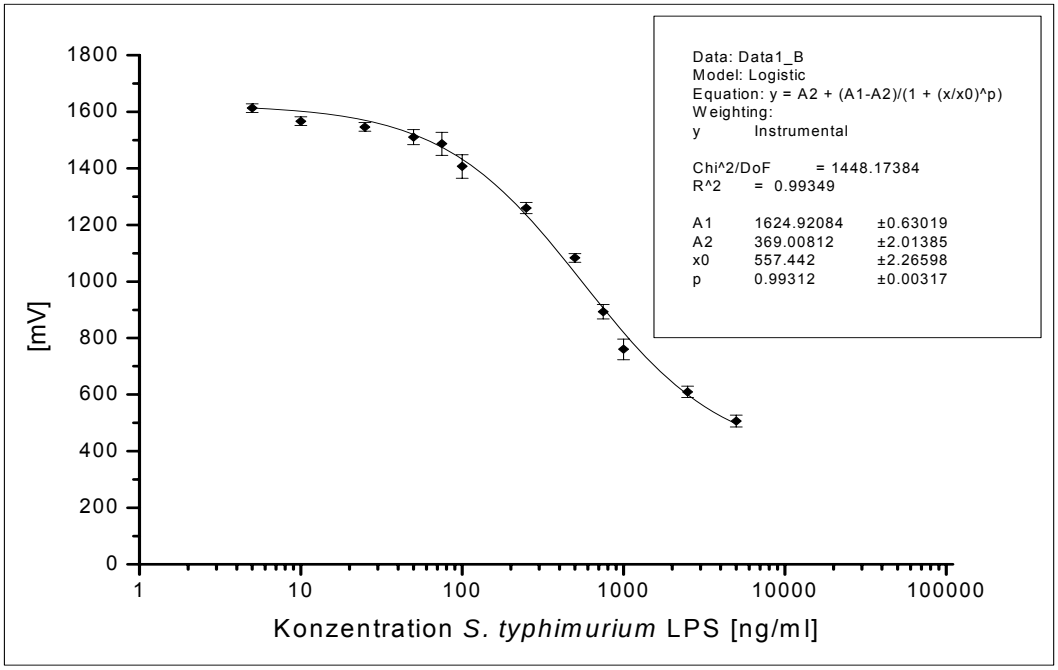


Abbildung 147 **Kalibrationsreihe der kompetitiven Detektion von *S. typhimurium* LPS mit Magnetic Beads in CCWW.** Der Blindwert (0 ng LPS/ml) betrug 1680 mV.

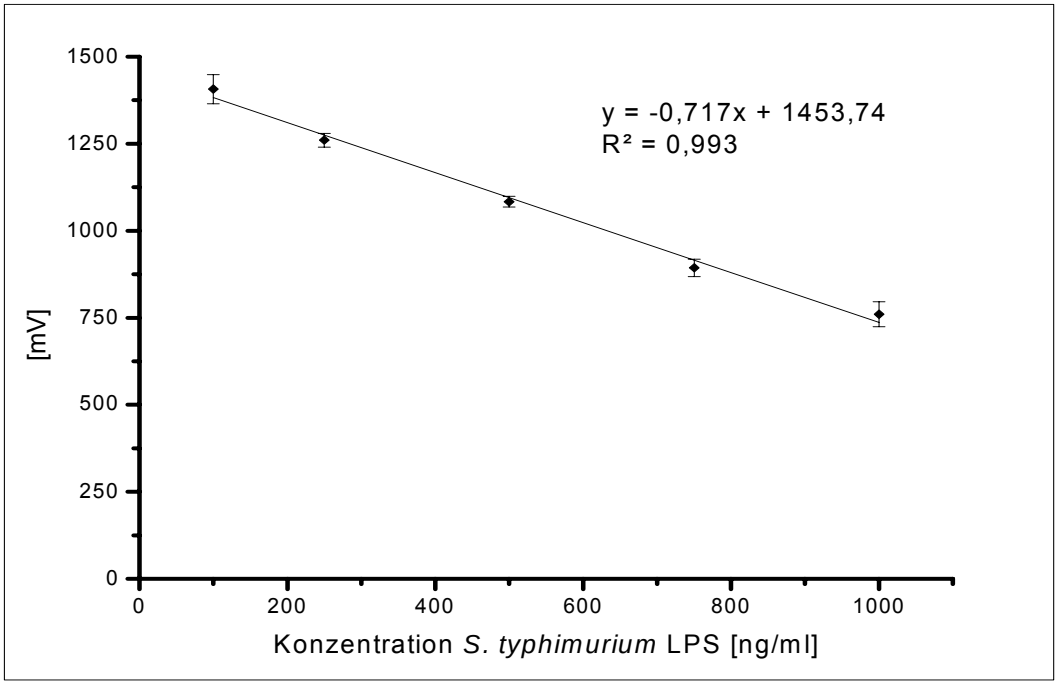


Abbildung 148 **Linearer Messbereich der Kalibrationsreihe der kompetitiven Detektion von *S. typhimurium* LPS mit Magnetic Beads in CCWW.**

Der lineare Messbereich dieser Kalibration betrug 100 – 1000 ng LPS pro ml CCWW-Probe. Die Standardabweichungen der Einzelwerte und die Linearität der Ausgleichsgerade sind etwas schelchter als bei der Kalibration in Puffer, aber immer noch gut für eine so komplexe Probenmatrix.

Auch für diese Matrix wurden die Variationskoeffizienten bestimmt. Es wurden die Konzentrationen 0 ng/ml (Blindwert), 50 ng/ml, 250 ng/ml und 1000 ng pro ml LPS jeweils 6-mal vermessen.

Tabelle 37 **Intra-Assay des kompetitiven *S. typhimurium*-Assays mit Antikörper in CCWW.**

Konzentration LPS [ng/ml]	Standardabweichung [%]
0 ng/ml	2,8 %
50 ng/ml	5,7 %
250 ng/ml	2,8 %
1000 ng/ml	2,8 %
Gesamt	**3,5 %**

Die bestimmten Variationskoeffizienten sind für einen immunologischen Test in einer Realmatrix sehr gut und zeigen die hohe Genauigkeit dieses Systems.

3.9.3.3 Detektion mittels magnetischer Extraktion aus Realmatrix

Zusätzlich zu der sequentiellen Detektion wurde auch die Messung per magnetischer Extraktion für dieses Analysensystem getestet. Hierbei wurde die inkubierte CCWW-Probe wie in Kap. 4.9.3.2 mit biotinyliertem Detektionsantikörper anti-ST_B und Magnetic Beads versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Zu detektierendes LPS wurde dotiert. Anschließend wurden die Magnetic Beads magnetisch abgetrennt und in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 mit 10 % (v/v) Caseinpuffer resuspendiert. Diese Lösung wurde dann über die Säule gegeben, weitere 30 Minuten inkubiert und nach einem abschließenden Spülschritt mit Messpuffer analysiert.

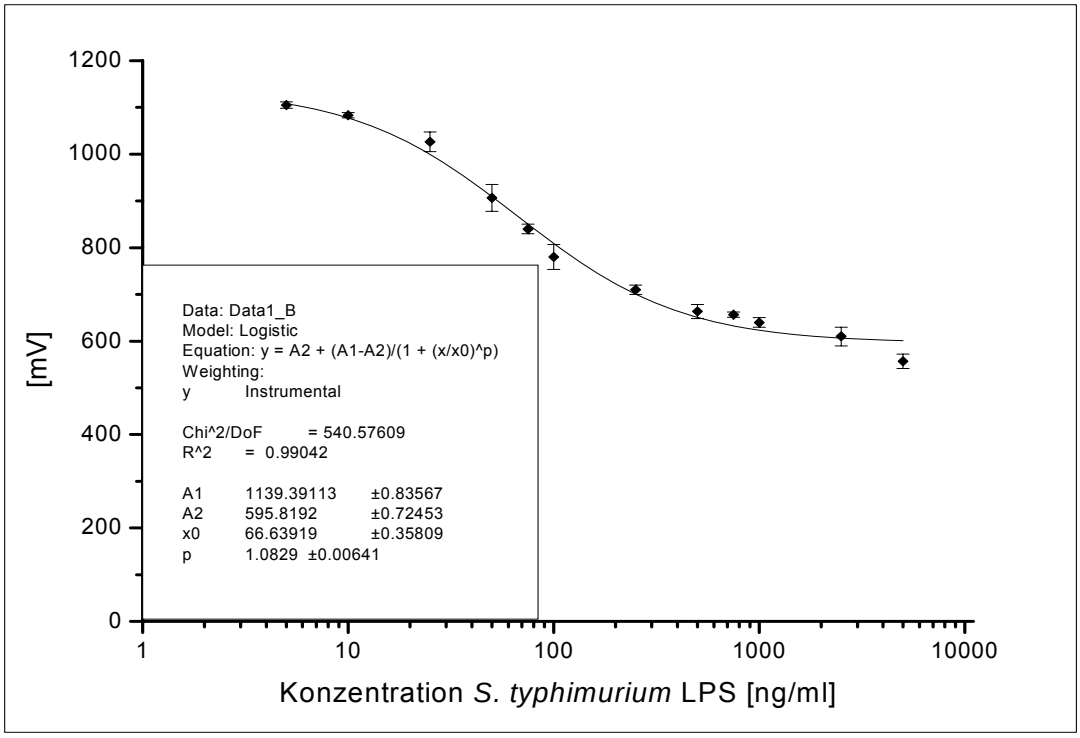


Abbildung 149 **Kalibrationsreihe der kompetitiven Detektion mit magnetischer Extraktion von *S. typhimurium* LPS mit Magnetic Beads in CCWW.** Der Blindwert (0 ng LPS/ml) betrug 1130 mV.

Die Analyse dieser Kalibrationsreihe ergab folgenden linearen Messbereich.

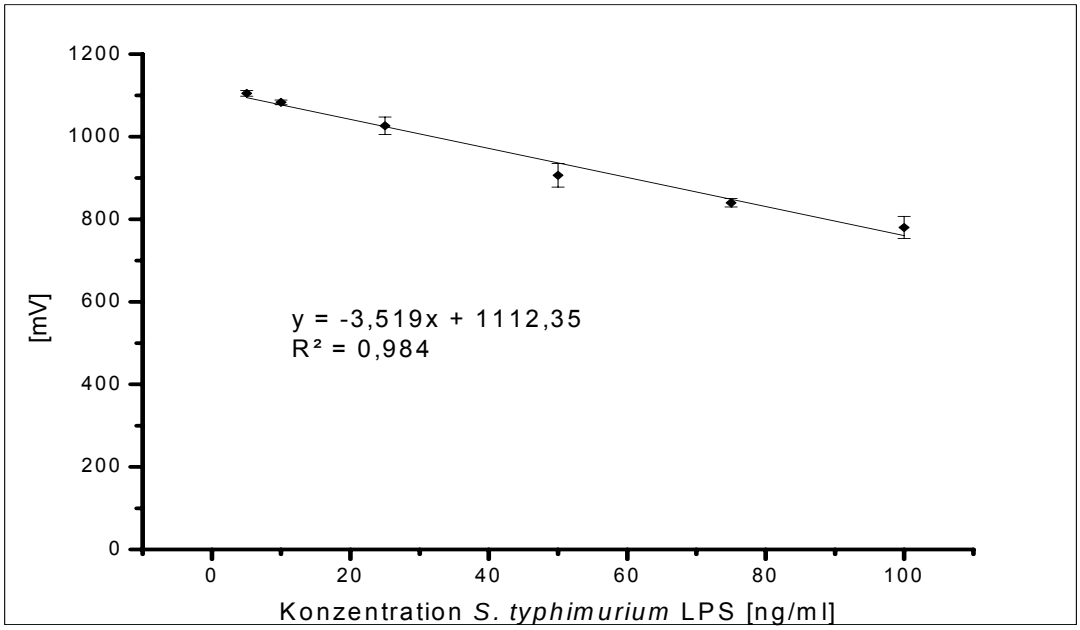


Abbildung 150 **Linearer Messbereich der Kalibrationsreihe der kompetitiven Detektion mit magnetischer Extraktion von *S. typhimurium* LPS mit Magnetic Beads in CCWW.**

Der lineare Messbereich dieser Kalibrationsreihe mit magnetischer Extraktion zur Detektion von *S. typhimurium* LPS auf CCWW betrug 5 bis 100 ng LPS pro ml bei einem CCWW-Probenvolumen von 500 µl. Standardabweichungen der Einzelwerte und die Linearität der Ausgleichsgerade sind für eine Realmatrix wiederum akzeptabel. Das Detektionssystem wird durch die Anwendung des Verfahrens der magnetischen Extraktion um den Faktor 10 sensitiver.

Zur Bestimmung des Variationskoeffizienten wurde ebenfalls ein Intra-Assay durchgeführt. Die jeweils 6-mal getesteten LPS-Konzentrationen waren aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den vorherigen kompetitiven Assays: 0 ng/ml (Blindwert), 50 ng/ml, 250 ng/ml und 1000 ng pro ml LPS.

Tabelle 38 **Intra-Assay des kompetitiven *S. typhimurium*-Assays mit magnetischer Extraktion in CCWW.**

Konzentration LPS [ng/ml]	Standardabweichung [%]
0 ng/ml	3,4 %
50 ng/ml	3,5 %
250 ng/ml	3,6 %
1000 ng/ml	2,0 %
Gesamt	**3,1 %**

Die bestimmten Variationskoeffizienten sind für dieses System absolut akzeptabel und zeigen erneut die Praktikabilität dieses Testsystems zur Detektion von *S. typhimurium* LPS aus Realmatrices, selbst in sehr geringen Analyt-Konzentrationen.

3.10 Detektion von Clostridium botulinum

Die Detektion von *Clostridium botulinum* Toxoid B (BotoxB) erfolgte per SPR und magnetischer Detektion. Zu diesem Zweck wurde eine Toxoid B-Präparation der Firma Senova GmbH verwendet. Zusätzlich standen ein polyklonales Fab-Fragment und zwei monoklonale Antikörper als Erkennungsmoleküle zur Verfügung. Beide Antikörper bildeten zusammen ein vom Hersteller (Hytest Ltd, Finnland) getestetes Sandwich-System zur Detektion von Botox B.

Als erster Schritt wurden die Detektionsmoleküle mittels SPR auf ihre Affinität zur Botox B-Präparation getestet. Hierfür wurde eine C18-Oberfläche auf dem Goldchip erzeugt und diese als Immobilisierungsmatrix für das Botox B-Protein verwendet. Das immobilisierte Molekül sollte dann nach Absättigung verbleibender freier Bindungsstellen mit BSA durch die zugegebenen Detektionsmoleküle erkannt und durch Anlagerung an die Oberfläche markiert werden. Abbildung 151 zeigt eine schematische Darstellung dieses Messprinzips.

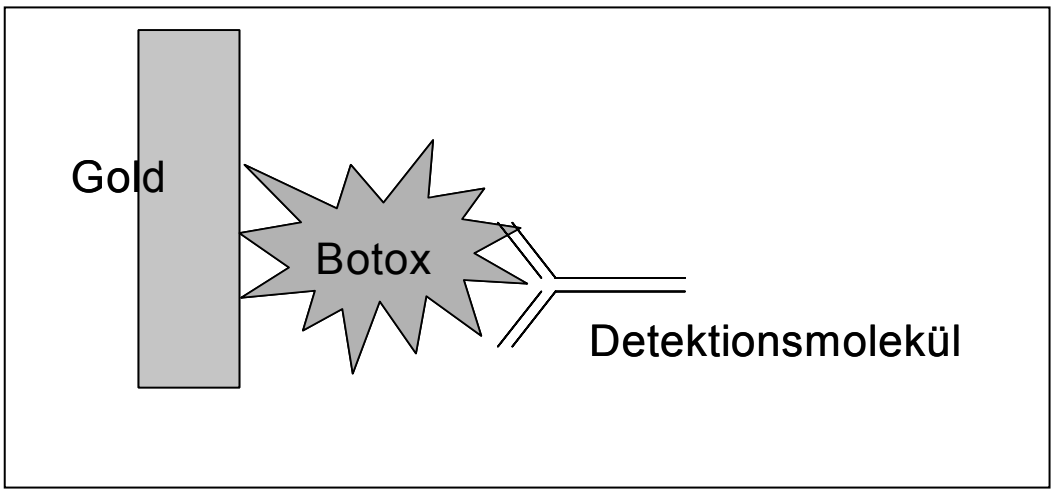


Abbildung 151 Schematische Darstellung der Testung der Detektionsmoleküle.

Die Botox B-Präparation wurde 1:50 (v/v) verdünnt. Die Konzentration der Detektionsmoleküle betrug Fab 500 µg/ml, ACBB-18 200 µg/ml und ACBB-27 200 µg/ml. Die BSA-Konzentration betrug 250 µg/ml. Als Messpuffer diente 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3.

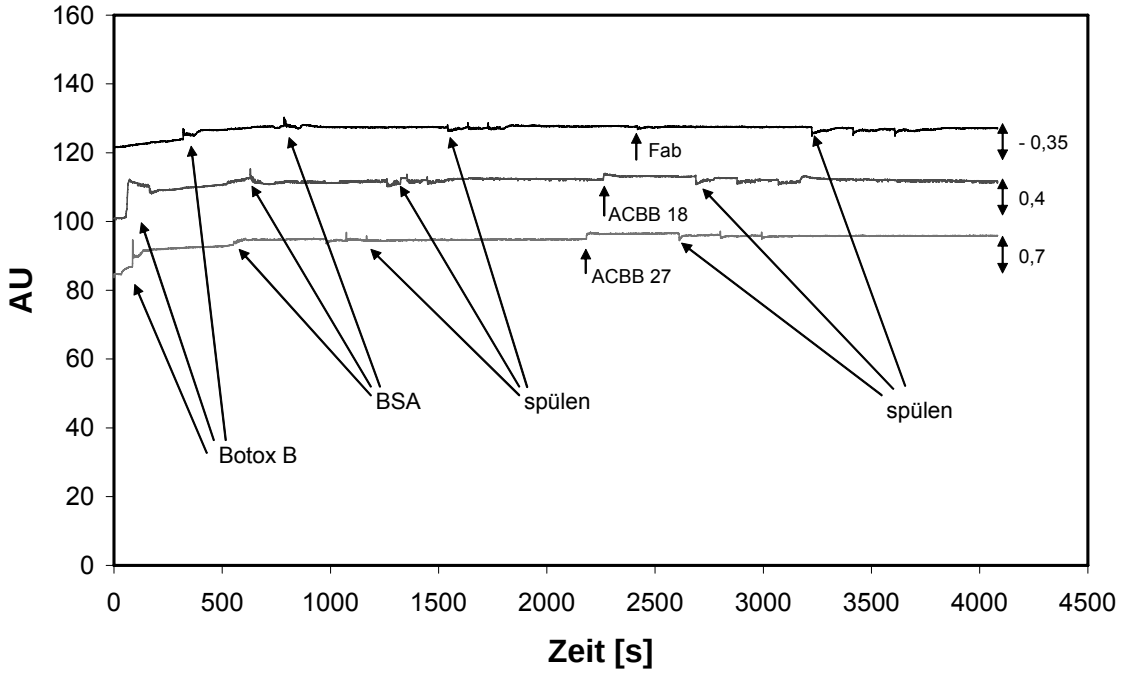


Abbildung 152 **Testung der Affinität zwischen Detektionsmolekülen und Botox B-Präparation.**

Man erkennt keine Anlagerung des Fab-Moleküls. Auch die beiden monoklonalen Antikörper binden kaum an die Oberfläche. Die Affinität der Detektionsmoleküle zur Botox B-Präparation scheint nicht besonders hoch zu sein.

3.10.1 Detektion von Botox B mit SPR im Sandwich-Verfahren

Aufgrund der geringen Affinität der Detektionsmoleküle zum Analyten wurde ein Sandwich-Detektionssystem mit beiden monoklonalen Antikörpern getestet. Dies entsprach der Vorgabe des Antikörper-Herstellers. Abbildung 153 zeigt eine schematische Darstellung des Messprinzips.

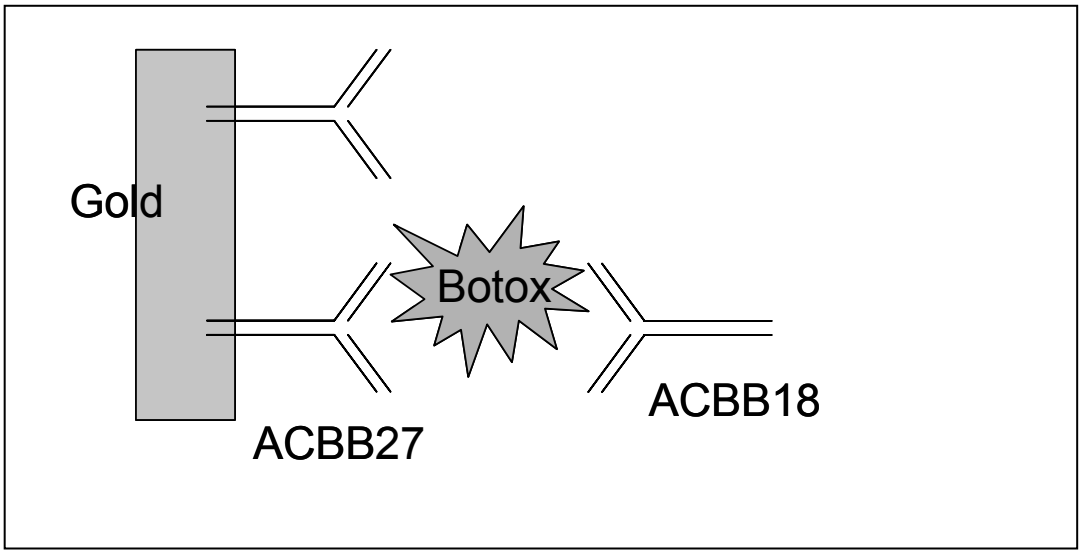


Abbildung 153 Schematische Darstellung der Detektion von Botox B im Sandwich-Verfahren.

Hierzu wurde der erste Antikörper, ACBB 27, auf einer C18-Matrix auf dem Goldchip immobilisiert. Freie Bindungsstellen wurden mit BSA abgesättigt und anschließend das Botox B zugegeben. Nach einem Spülschritt erfolgte die Zugabe des zweiten Antikörpers ACBB 18. Die Konzentration der Lösungen war wiederum Botox B-Präparation 1:50 (v/v), ACBB 18 200 µg/ml, ACBB 27 200 µg/ml und BSA 250 µg/ml. Es wurde mit 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 als Messpuffer verwendet.

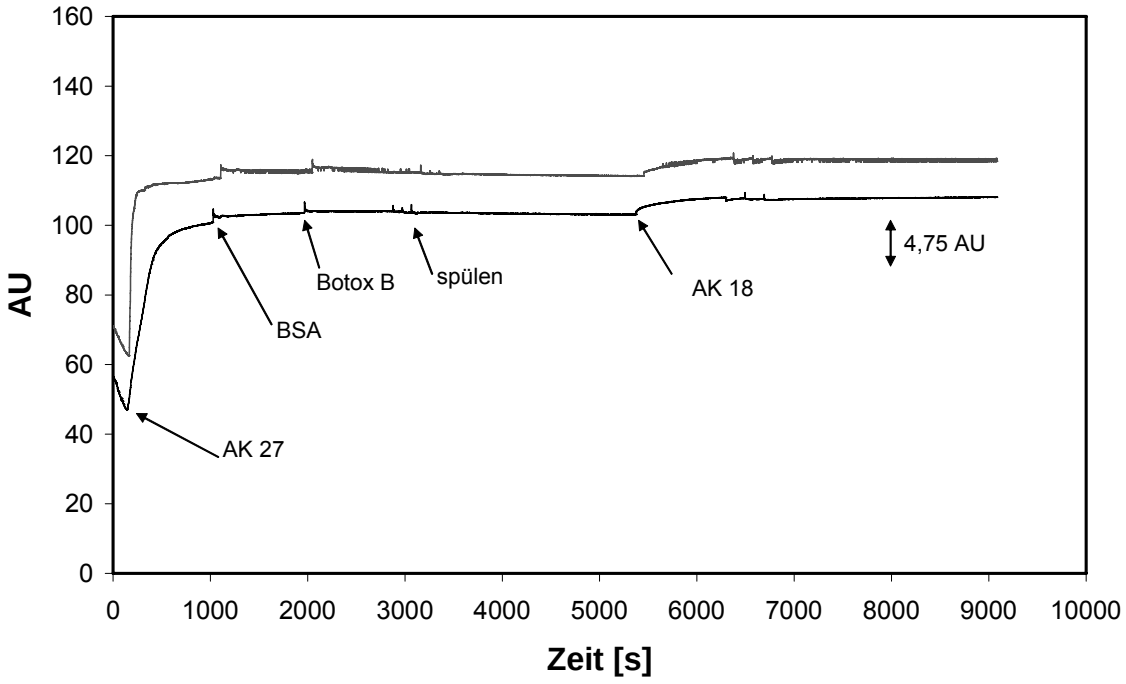


Abbildung 154 Detektion von Botox B im Sandwich-Verfahren mit monoklonalen Antikörpern. Doppelbestimmung.

Man erkennt eine leichte Anlagerung des zweiten Antikörpers an die Oberfläche. Dies kann durch eine Extraktion und Präsentation von Botox B mittels des ersten Antikörpers und anschließender Anlagerung des zweiten Antikörpers bedingt sein.
Zur Signalverstärkung wurde der zweite Antikörper, ACBB 18, biotinyliert. Dieser kann nun zusätzlich durch Streptavidin markiert werden und hierdurch stärkere Signal erzeugen.

Zu diesem Zweck erfolgte eine Biotinylierung. Der Assay wurde wie oben wiederholt und als zusätzlich letzter Schritt Streptavidin mit einer Konzentration von 250 µg/ml in PBS-Puffer zugegeben.

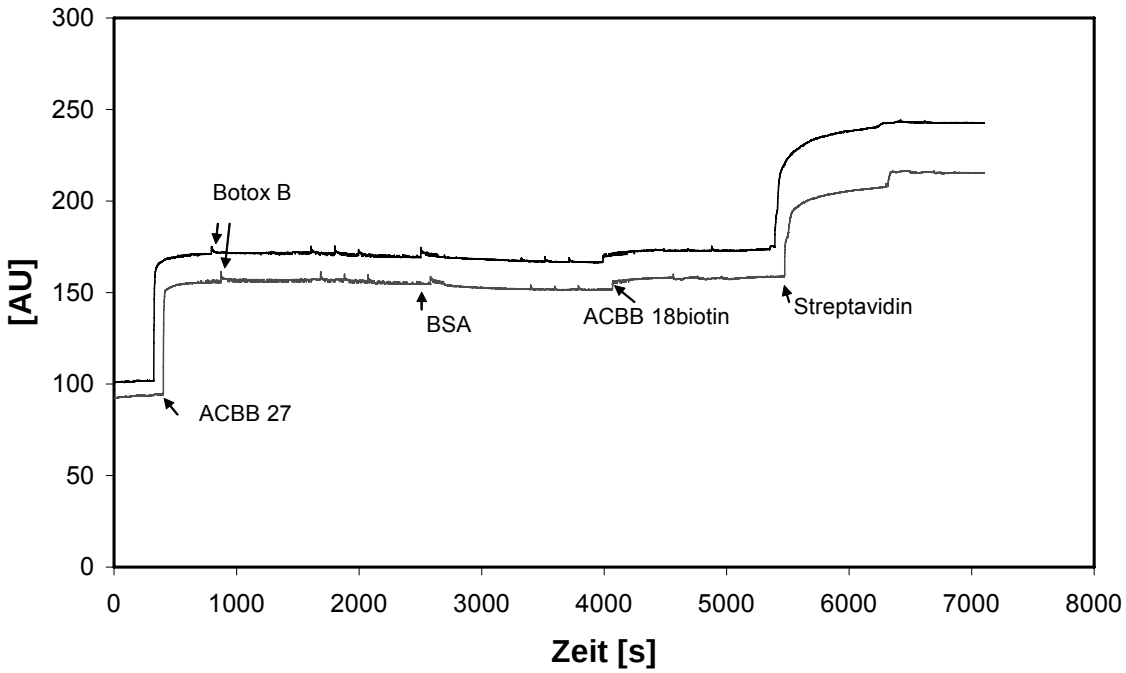


Abbildung 155 **Detektion von Botox B im Sandwich-Verfahren mit monoklonalen Antikörpern und Streptavidin.** Doppelbestimmung.

Man erkennt eine deutliche Anlagerung des Streptavidins an den gebundenen ACBB 27 Antikörper. Zur Kontrolle wurde die Messung analog nur ohne den Analyten (Botox B) wiederholt. Es sollte nun zu keiner Bindung des ACBB 27 und außerdem zu keiner Streptavidin-Anlagerung kommen.

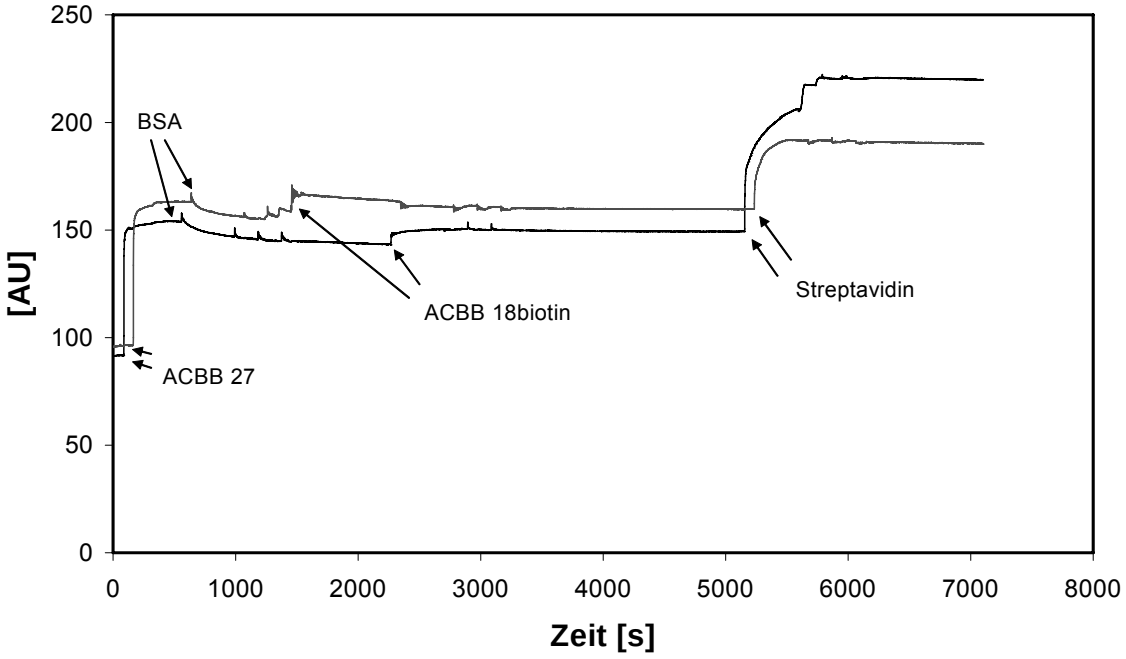


Abbildung 156 **Kontrolle der Detektion im Sandwich-Verfahren mit monoklonalen Antikörpern und Streptavidin.** Doppelbestimmung**.**

Die Anlagerung des ACBB 27 Antikörpers an die Oberfläche hängt nicht vom Analyten Botox B ab und ist daher unspezifisch. Das zugegebene Streptavidin bindet ebenfalls an den unspezifisch angelagerten Antikörper und führt somit nicht zu sinnvollen Signalen.

Die Detektion von Botox B mit SPR kann dementsprechend nicht realisiert werden. Die Affinität der Detektionsmoleküle zum Analyten reicht für dieses Detektionssystem nicht aus.

3.10.2 Detektion von Botox B mit magnetischer Detektion

Zur Testung der magnetischen Detektion von Botox B wurde ebenfalls das Sandwich-Verfahren der beiden monoklonalen Antikörper verwendet. Abbildung 157 zeigt eine schematische Darstellung des Messprinzips.

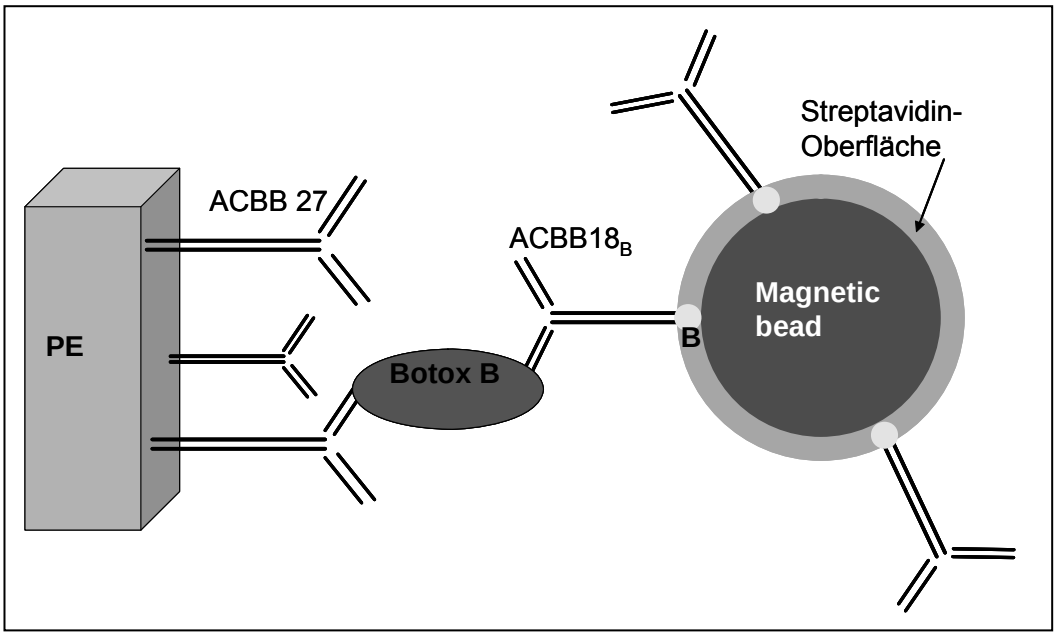


Abbildung 157 **Schematische Darstellung der Detektion von Botox B im Sandwich-Verfahren mit Magnetic Beads**. PE = Polyethylen-Sinterkörper, B = biotinylierter Antikörper.

Zuerst erfolgte eine Optimierung der optimalen Antikörper-Konzentrationen für die Antikörper ACBB18 und ACBB27. Hierzu wurde folgende Assay-Durchführung verwendet. Antikörper ACBB27 wurde adsorptiv an die PE-Sinterkörperoberfläche immobilisiert und für 1 h inkubiert. Dies erfolgte in 0,1 M Carbonat-Puffer pH 9,5. Freie Bindungsstellen wurden mit Caseinpuffer (1:10 v/v) in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 abgesättigt, die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Die Magnetic Beads wurden ohne Filtration verdünnt (1:100 v/v) in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 und mit dem biotilyierten Antikörper ACBB18 versetzt. Die so erhaltene Bead-Lösung wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (je 500 µl Flüssigkeit) verteilt und mit der jeweils zu detektierenden Menge an Analyt (Botox B) versetzt. Diese Probe wurde für 1 h vorinkubiert. Anschließend wurde die gesamte Probe über die beschichtete Säule gegeben, für 30 Minuten inkubiert und anschließend zwei mal mit 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 gespült. Abschließend wurde die Säule im Magnetsensor vermessen.

Zur Bestimmung der optimalen Antikörper-Konzentration wurde die Botox B-Konzentration konstant gehalten (Botox B-Präparation 1:5000 v/v verdünnt). Die

Konzentration des Extraktionsantikörpers (ACBB27) und des Markierungsantikörpers (ACBB18) wurden variiert, der jeweilige Sandwich-Partner bei 10 µg pro Säule konstant gehalten.

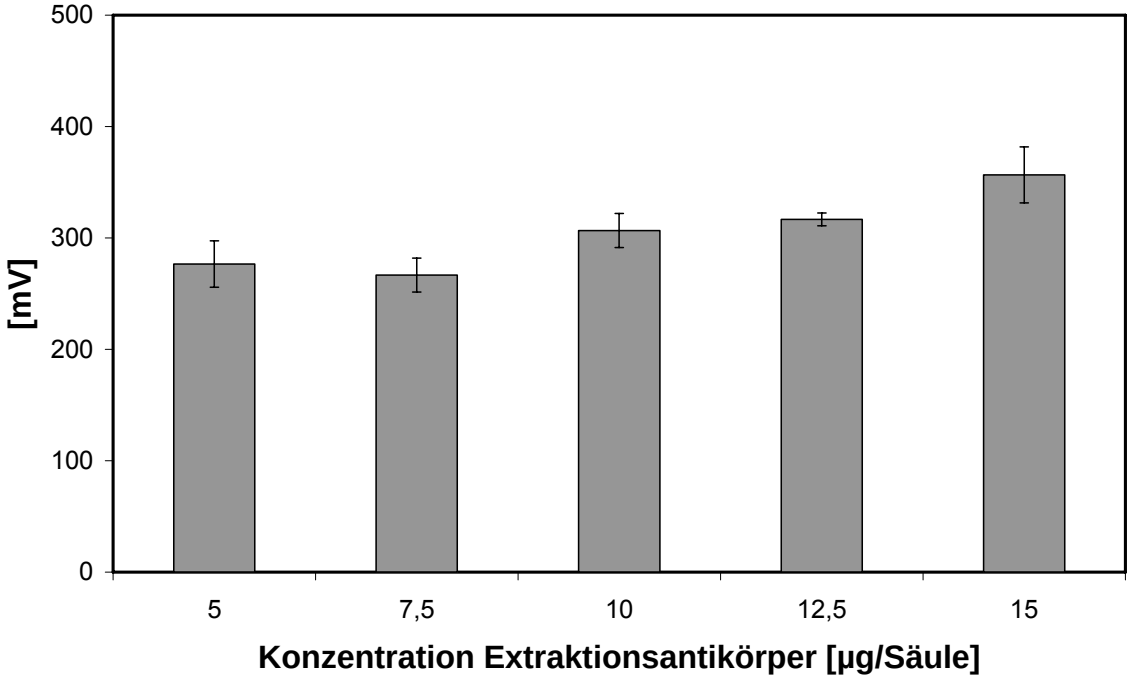


Abbildung 158 **Optimale Konzentration des Extraktionsantikörpers ACBB27.** (n=3)

Man erkennt keine klare Aussage zur optimalen Antikörper-Konzentration. Der Trend weist auf die Notwendigkeit hoher Antikörper-Konzentrationen hin. Es wurde im Folgenden mit 15 µg ACBB27 pro Säule gearbeitet.

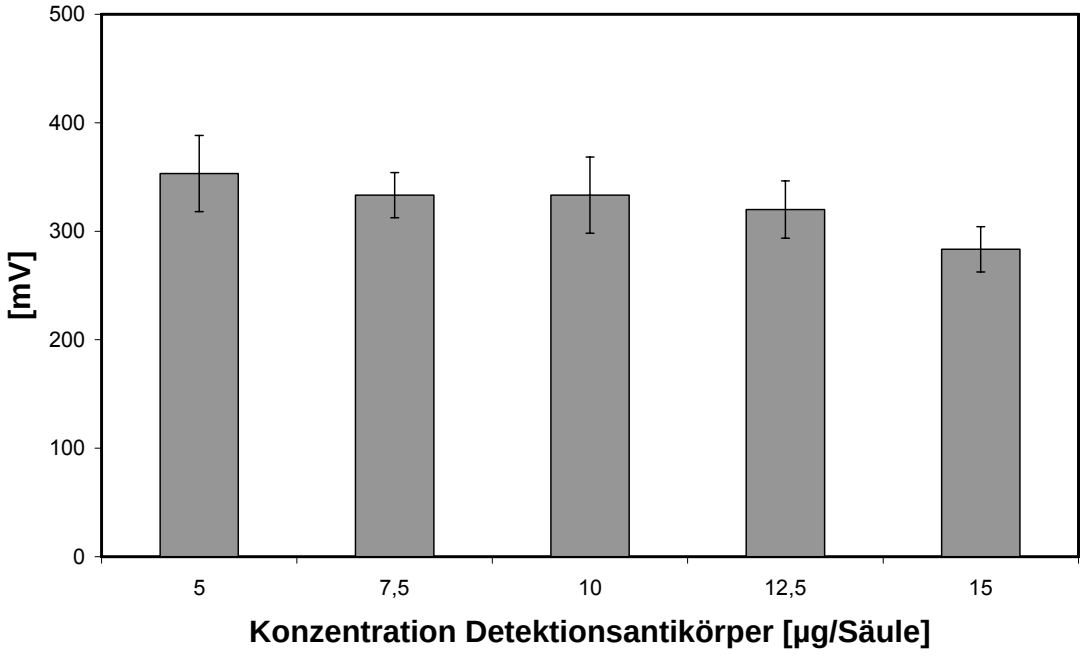


Abbildung 159 **Optimale Konzentration des biotinylierten Detektionsantikörpers ACBB18.** (n=3)

Hier weist der Trend auf eher geringe Antikörper-Konzentrationen hin. Für die folgende Kalibrationsreihe wurde 7,5 µg ACBB18 pro Säule verwendet.

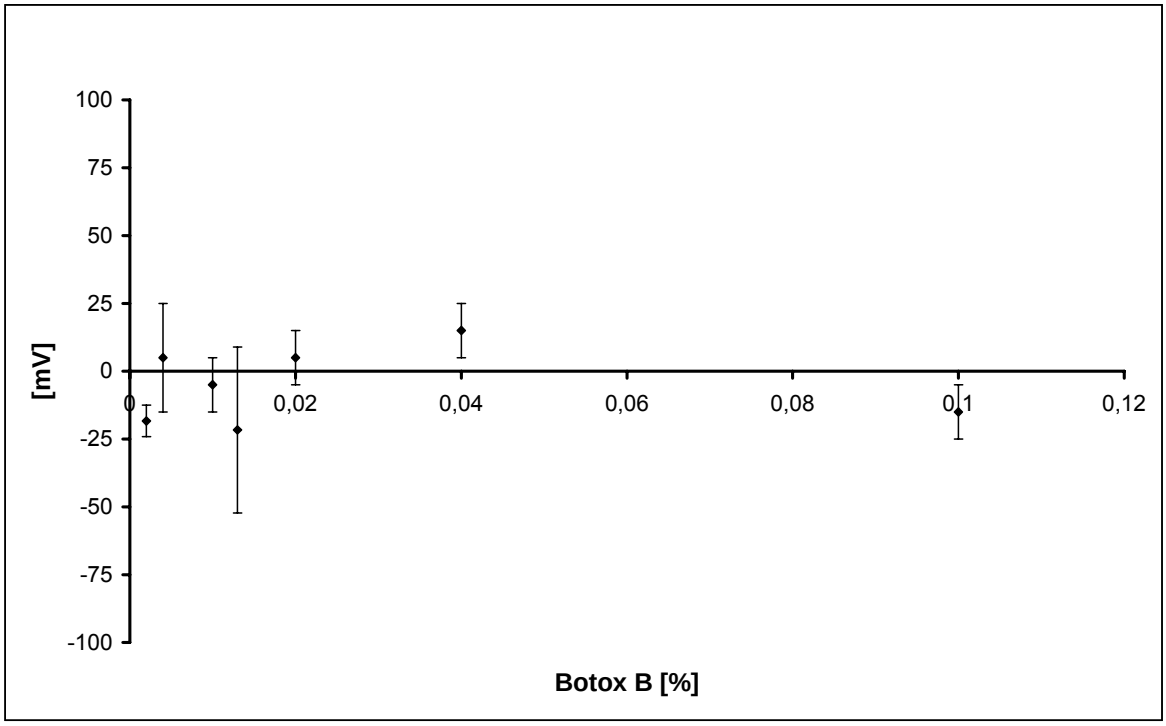


Abbildung 160 **Versuch einer Kalibrationsreihe zur Detektion von *Clostridum botulinum* Toxoid B.**

Wie in Abb. 160 ersichtlich, wurde keine Konzentrationsabhängigkeit des Messsignals gegenüber der eingesetzten Botox B-Konzentration festgestellt. Eine Detektion von Botox B mit den vorhandenen Detektionsmolekülen ist dementsprechend nicht möglich.

3.11 Aufbau einer Fluidik mit magnetischer Detektion

3.11.1 Detektion von CRP in Puffer

Zur Evaluierung der Messanordnung wurde der bereits in Kap. 2.4 beschriebenen CRP-Assay verwendet. Die Messsäulen wurden im Vorfeld adsorptiv mit dem Extraktionsantikörper antiCRP C2 beschichtet und mit Caseinpuffer (1:10 v/v in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3) blockiert.

Zum Aufbau eines möglichst sensitiven und reproduzierbarem Messsystems mit einem fluidischen Transport der Magnetic Beads wurden die Erkenntnisse des CRP-Assays weitesgehend übertragen. Verwendet wurden dementsprechend die Magnetic Beads Typ SAV1 (NCO) mit einer durchschnittlichen Größe von 0,7-1 µm. Außerdem wurde 0,15 M PBS-Puffer als Mess- und Probenpuffer verwendet. Weiterhin wurden die beiden sinnvoll verfügbaren Typen des PE-Sinterkörper (180.C mit ca. 50 µm Porendurchmesser und 120.C mit ca. 100 µm Porendurchmesser) getestet.

Hierzu wurde eine Magnetic Bead-Lösung (500 µl, 1:100 v/v verdünnt in 0,15 M PBS-Puffer mit 10 µg biotinyliertem Markierungsantikörper (antiCRP $C6_B$) versetzt. Die Säule wurde vor der Messung mit 10 µg antiCRP C2 Antikörper in 0,1 M Carbonat-Puffer pH 9,5 beschichtet. Beim jeweiligen Messwert wurden 1000 ng/ml CRP (500 µl pro Säule) in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 durch die Messsäule gepumpt, anschließend wurde die Magnetic Bead-Lösung durch die Messsäule geleitet. Bei dem jeweiligen Blindwert wurde auf CRP-Lösung verzichtet und nur mit PBS-Puffer gespült. Ausgwertet wurde jeweils der Signalzuwachs zwischen Basislinie und Endwert. Aufgrund der begrenzten Magnetic Beads wurde bei der Optimierung der Assay-Parameter jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als zusätzliche Aussage zum jeweilgen Mittelwert werden per Pseudo-Fehlerbalken beide Messwerte dargestellt.

In einer ersten Messung fällt vor allem der relativ hohe Blindwert auf. Das Verhältnis Messwert / Blindwert ist bei beiden Filtertypen in etwa gleich, obwohl die absoluten Signale beim PE-Sinterkörper Typ 120.C etwas geringer sind. Aufgrund der bereits beschriebenen guten Erfahrungen mit dem PE-Sinterkörper Typ 180.C wurde dieser weiterhin eingesetzt.

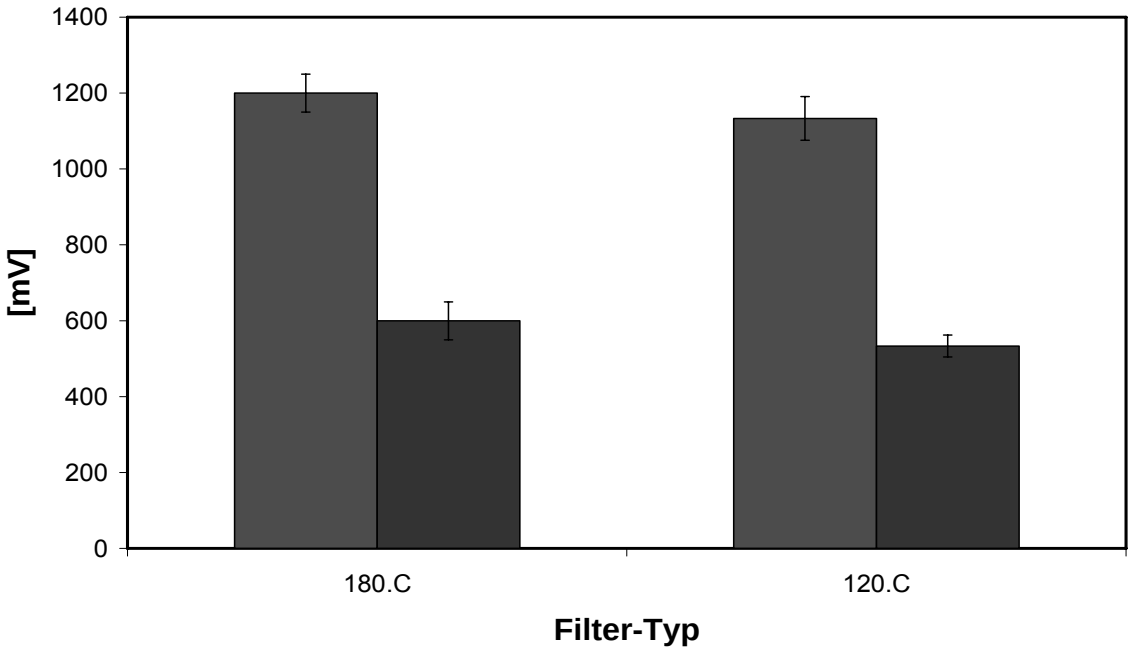


Abbildung 161 **Vergleich der PE-Sinterkörper bei einer fluidischen Messung.** Links = Messwert, Rechts (Schwarz) = Blindwert ohne CRP, Flussrate 0,5 ml/min (n=2).

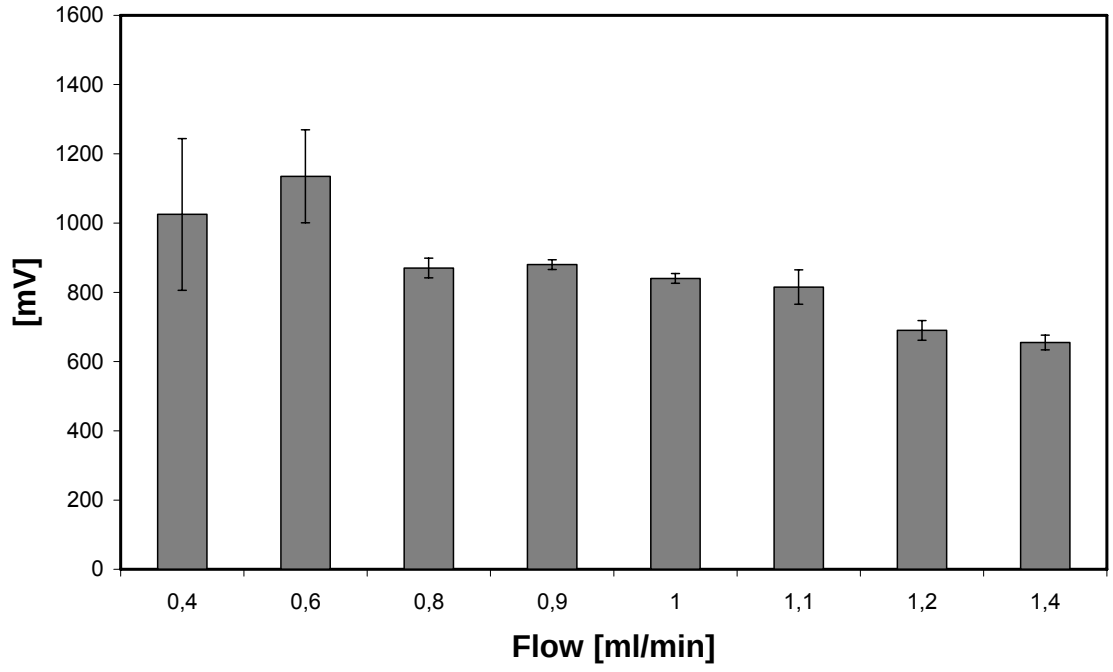


Abbildung 162 **Vergleich der Messwerte bei unterschiedlichem Pufferfluss.** (n=2)

In einer weiteren Untersuchung wurde der optimale Pufferfluß analysiert. Der Pufferfluß hat sowohl Einfluss auf die Transportrate der Magnetic Beads, aber auch auf den Flüssigkeitsdruck innerhalb der Messsäule. Verschiedene Pumpraten wurden getestet und hierfür jeweils wieder der oben beschriebene CRP-Assay durchgeführt.

Die höchsten Signalzuwächse konnten bei geringen Flussraten bestimmt werden. Hierbei kam es aber zu einer Sedimentation und damit verbundenen Deponierung der Magnetic Beads im Schlauchsystem. Dies führte unter anderem zu den stark abweichenden Messwerten bei einem Fluß von 0,4 und 0,6 ml pro min. Ein möglichst hohes Signal in Verbindung mit einer niedrigen Streuung konnte bei 0,9 ml pro min erreicht werden. Diese Flussrate wurde im Folgenden beibehalten.

Als weiterer Modifikationsschritt der Messanordnung wurde eine Vorinkubation des Analyten mit den Magnetic Beads und dem Markierungsantikörper antiCRP $C6_B$ erwogen. Hierzu wurde die Magnetic Bead-Lösung mit bereits gekoppeltem Antikörper direkt in die CRP-haltige Probe gegeben und für ca. 1 h inkubiert. Die längere Kontaktzeit zwischen Antikörper und CRP sollte zu einer höheren Bindungsausbeute führen. Der erhaltene Komplex aus CRP-, Antikörper- und Magnetic Bead kann dann durch den auf der Säule immobilisierten Extraktionsantikörper gebunden und somit detektiert werden.

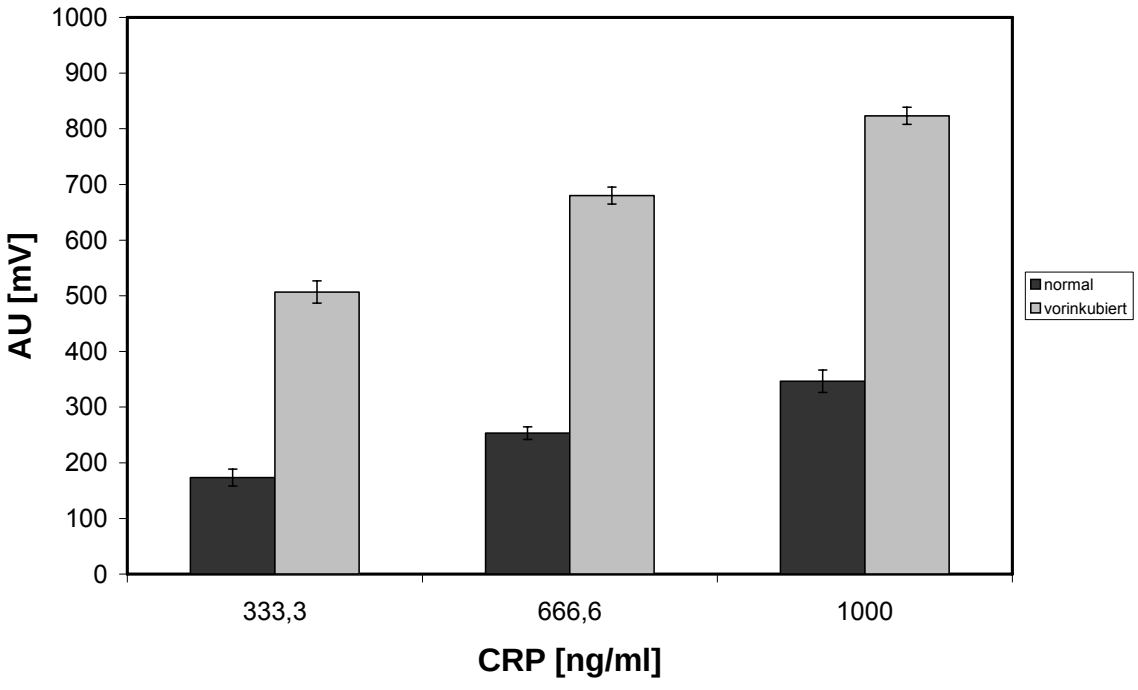


Abbildung 163 **Vergleich der Messwerte mit und ohne Vorinkubation.** (n=2)

Man erkennt ein deutlich höheres Signal mit Vorinkubation, im Vergleich zum separatem Durchpumpen des CRP durch die Messsäule. Daher wurde die Vorinkubation zwischen CRP und Magnetic Beads auch bei den weiteren Messungen durchgeführt.

Zur weiteren Verbesserung dieses fluidischen CRP-Assays wurde die optimale Konzentration des am PE-Sinterkörper immobilisierten Extraktionsantikörpers antiCRP C2 bestimmt. Hierzu wurde der CRP-Assay wie bereits oben mit allen beschrieben Optimierungen ausgeführt. Die Konzentration des CRP betrug 1000 ng/ml. Die Konzentration des Extraktionsantikörpers wurde variiert, die Konzentration des Markierungsantikörpers antiCRP $C6_B$ betrug 10 µg pro Säulenequivalent an Magnetic Beads (500 µl).

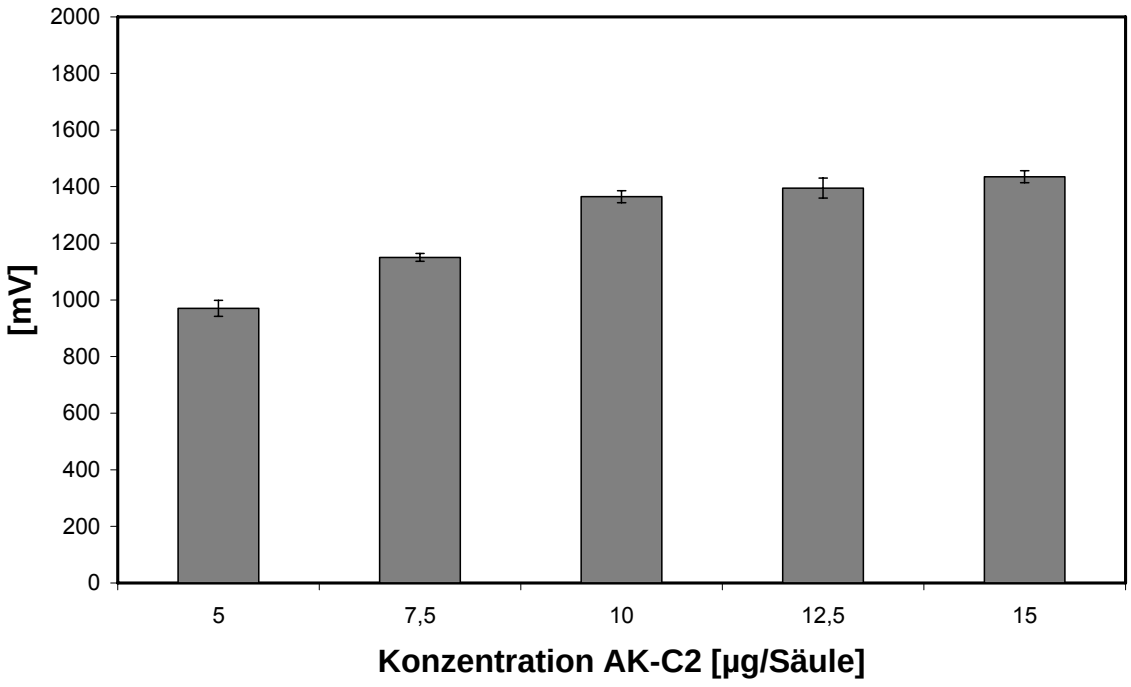


Abbildung 164 Vergleich der Messwerte bei unterschiedichem antiCRP C2-Konzentrationen. (n=2)

Die optimale antiCRP C2 Konzentration beträgt 10 µg pro Säule. Eine Erhöhung der Antikörper-Konzentration bewirkt zwar anscheinend noch leichte Signalzuwächse, diese liegen aber im Bereich der Standardabweichung. Der ökonomisch optimale Punkt scheint also bei 10 µg pro Säule erreicht zu sein.

Analog hierzu wurde die optimale Konzentration des Markierungsantikörpers antiCRP C6B bestimmt. Die CRP-Konzentration betrug ebenfalls 1000 ng/ml CRP; pro PE-Sinterkörper wurde die optimale Menge von 10 µg antiCRP C2 immobilisiert.

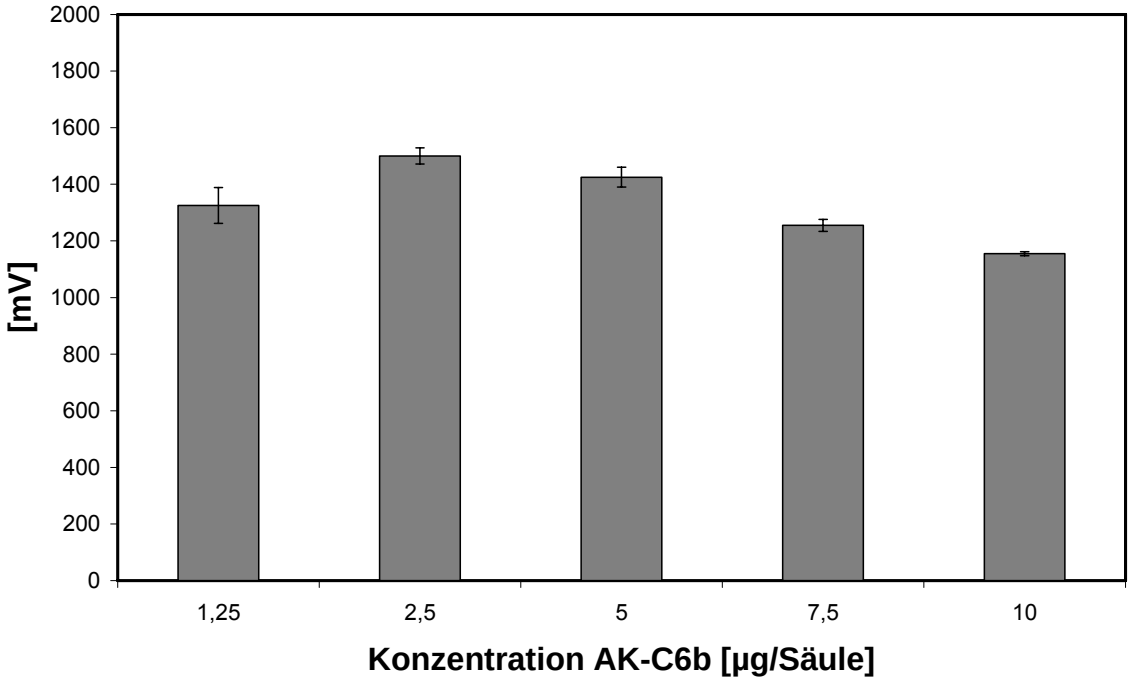


Abbildung 165 Vergleich der Messwerte bei unterschiedichem antiCRP $C6_B$-Konzentrationen. (n=2)

Die optimale Konzentration des Markierungsantikörpers antiCRP $C6_B$ beträgt 2,5 µg pro Säulenequilavent an Magnetic Bead-Lösung (500 µl). Höhere Konzentrationen an antiCRP $C6_B$ führen zu einer Reduzierung des Signals. Dies könnte sterische Gründe haben und wurde bereits beim CRP-Assay ohne Fluidik beobachtet.

Unter Einbehaltung der optimalen Assay-Parameter mit Vorinkubation, einer optimalen Flussrate von 0,9 ml/min und unter Verwendung von 10 µg pro Säule Extraktionsantikörper sowie 2,5 µg Markierungsantikörper pro Säulenequivalent an Magnetic Beads wurde eine Kalibration der CRP-Detektion getestet. Die Bestimmung erfolgte in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3.

Zur Auswertung wurde der jeweilige Messwert einer Konzentration bestimmt. Hierzu wurde der Basislinienanfangswert vom Endwert der abschließenden Plateauphase abgezogen; es wurde also der Signalzuwachs bestimmt. Die Bestimmung des Netto-Messwertes erfolgte nach Abzug des Blindwertes vom Messwert.

Abbildung 166 zeigt einige ausgewählte Signalkurven. In Abbildung 167 ist die entsprechende Kalibrationsgerade der Netto-Messwerte gezeigt.

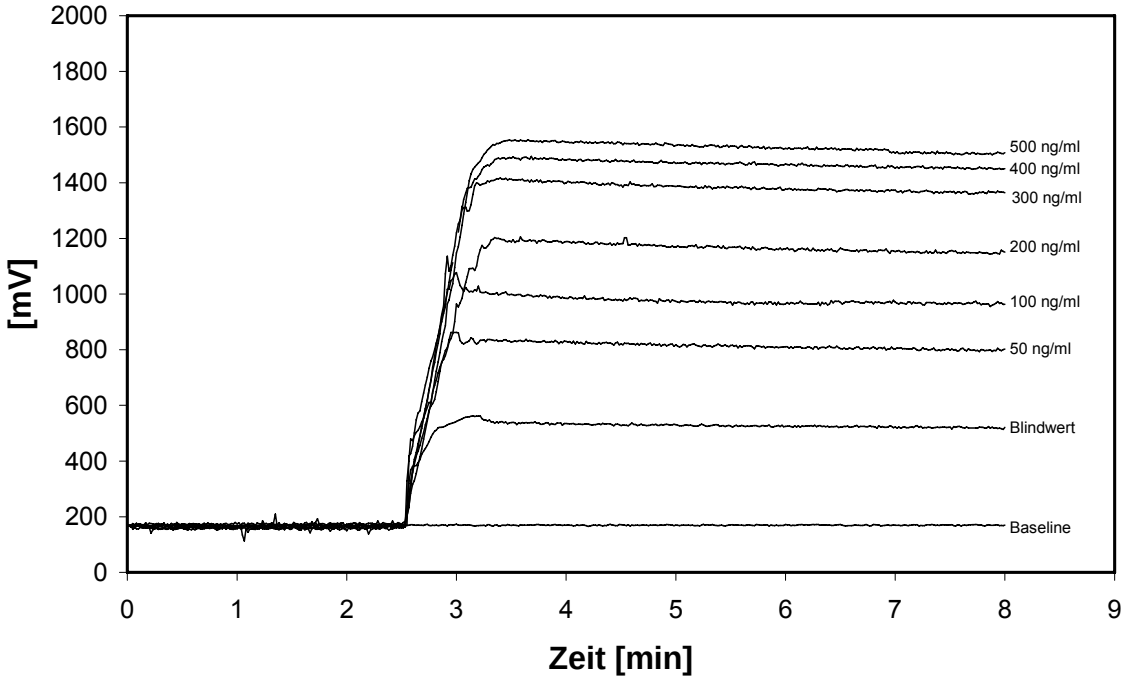


Abbildung 166 Vergleich der Signalkurven bei unterschiedichem CRP-Konzentrationen.

Bei einer Kalibration wurden folgende Messwerte ermittelt.

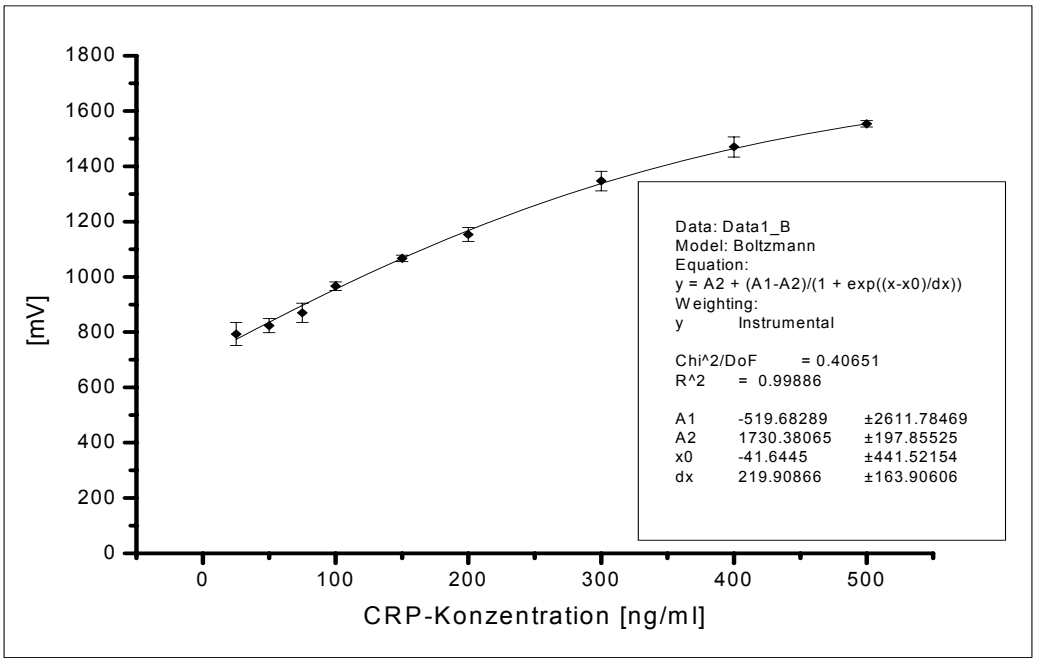


Abbildung 167 Kalibrationsgerade des fluidischen CRP-Assays in PBS-Puffer. Der Blindwert (0 ng CRP pro ml) betrug 540 mV, (n=3).

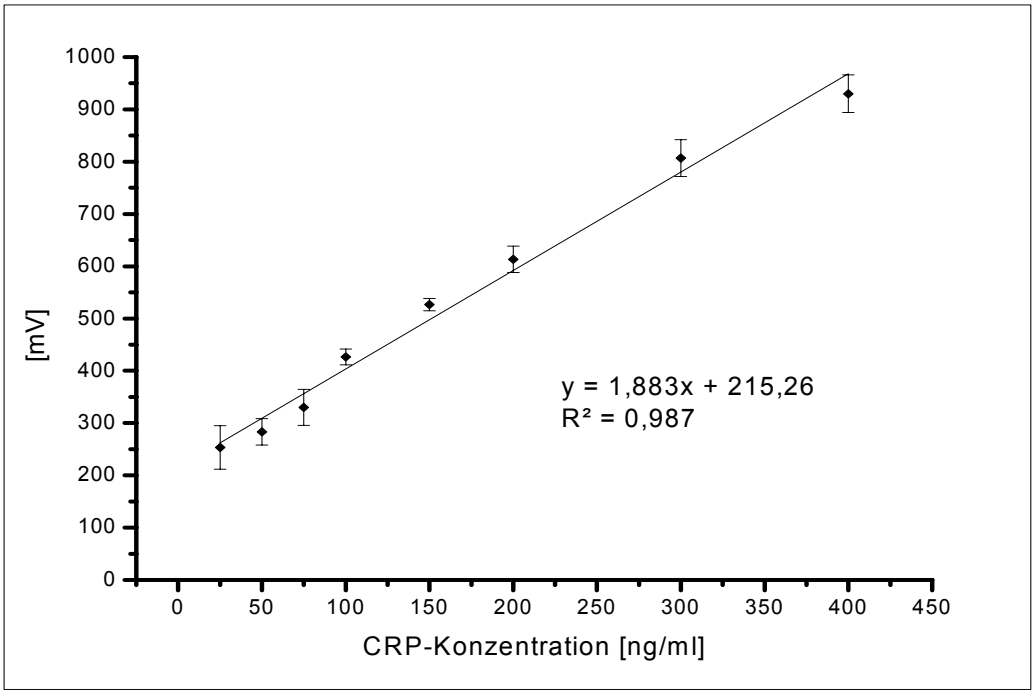


Abbildung 168 Linearer Messbereich des fluidischen CRP-Assays in PBS-Puffer (n=3).

Man erkennt einen linearen Messbereich von 25-400 ng CRP pro ml. Das Probenvolumen betrug 500 µl. Insbesondere bei niedrigen Analyt-Konzentrationen steigen die Standardabweichungen relativ stark an.

Zur Bestimmung der Standardabweichung und Verlässlichkeit dieses fluidischen Detektionssystems wurde ein Intra-Assay durchgeführt. Hierzu wurden vier verschiedene CRP-Probenkonzentrationen von 0 ng/ml (Blindwert), 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml jeweils 12-mal bestimmt. Tabelle 37 zeigt die Ergebnisse des Intra-Assays.

Tabelle 39 Bestimmung der Standardabweichung des CRP-Detektionssystems.

Konzentration CRP [ng/ml]	Standardabweichung [%]
0 ng/ml (Blindwert)	15,8 %
100 ng/ml	6,6 %
250 ng/ml	4,6 %
500 ng/ml	2,8 %
Gesamt	**7,5 %**

Die ermittelten Standardabweichungen sind gerade im niedrigen Konzentrationsbereich deutlich höher als bei höheren Konzentrationen. Insbesondere die Standardabweichung des Blindwertes von 15,8 % ist für einen immunodiagnostischen Tests recht hoch. Dies zeigt auch die hohe unspezifische Bindung bzw. Deponierung von Magnetic Beads im PE-Sinterkörper durch den hohen Systemdruck. Die Gesamtstandardabweichung von 7,5 % des gesamten Systems ist akzeptabel.

3.11.3 Detektion von CRP in Kaninchenserum

Als zusätzliche Realmatrix zur Detektion von CRP wurde Kaninchenserum verwendet. Dieses enthält kein humanes CRP und sollte daher auch kein starkes Hintergrundsignal erzeugen. Es wurde mit magnetischer Extraktion gearbeitet, da bei einem direkten Durchleiten des Kaninchenserums durch die Messapparatur es zu einer Blasenbildung aufgrund des hohen Proteingehaltes im Serum kam. Hierdurch konnte der dotierte CRP-Gehalt nicht sinnvoll quantifiziert werden.

Zur magnetischen Extraktion wurde CRP in die Serum-Probe dotiert und diese mit Markierungsantikörper antiCRP $C6_B$ und Magnetic Beads versetzt. Diese Mischung wurde für ca. 1 h inkubiert und anschließend die Magnetic Beads mit gebundenen Markierungsantikörpern und extrahiertem CRP in einem magnetischen Ständer abgetrennt und wieder in 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 (Messpuffer) resuspendiert.
Diese Lösung wurde anschließend durch die Messsäule gepumpt. Die Auswertung erfolgte analog zur Bestimmung des CRP-Gehaltes in Puffer (vgl. Kap. 3.11.2).

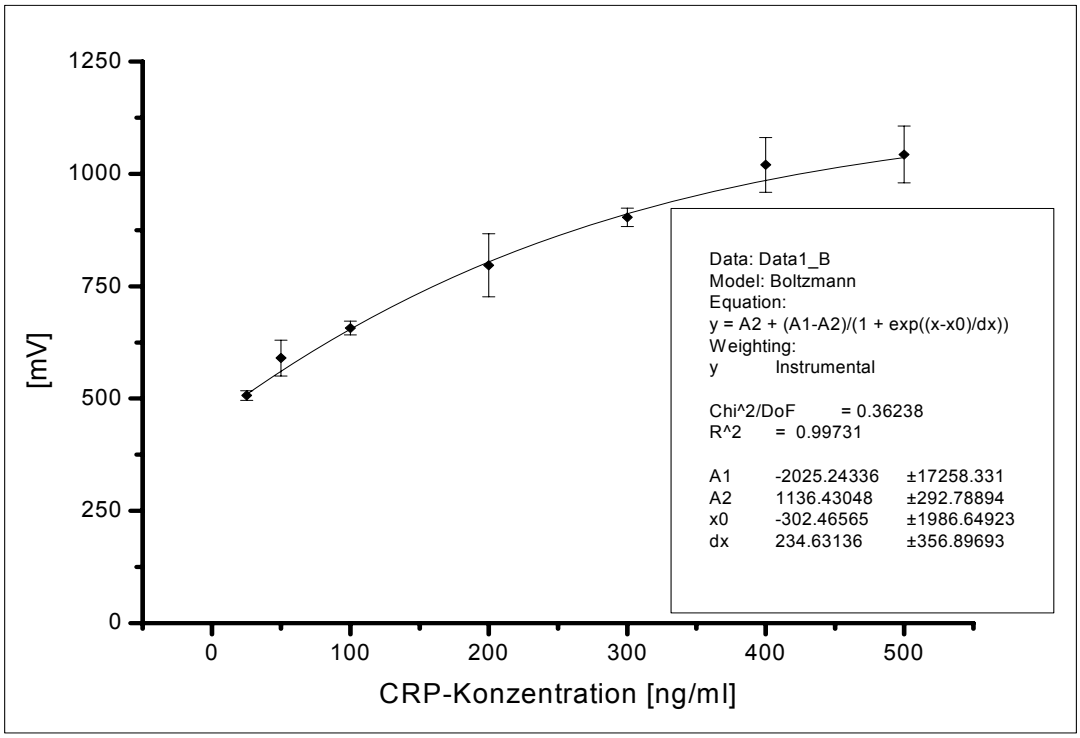


Abbildung 169 Kalibrationsgerade des fluidischen CRP-Assays mit magnetischer Extraktion aus Kaninchenserum. Der Blindwert (0 ng CRP pro ml) betrug 476 mV (n=3).

Folgender linearer Messbereich konnte abgeleitet werden.

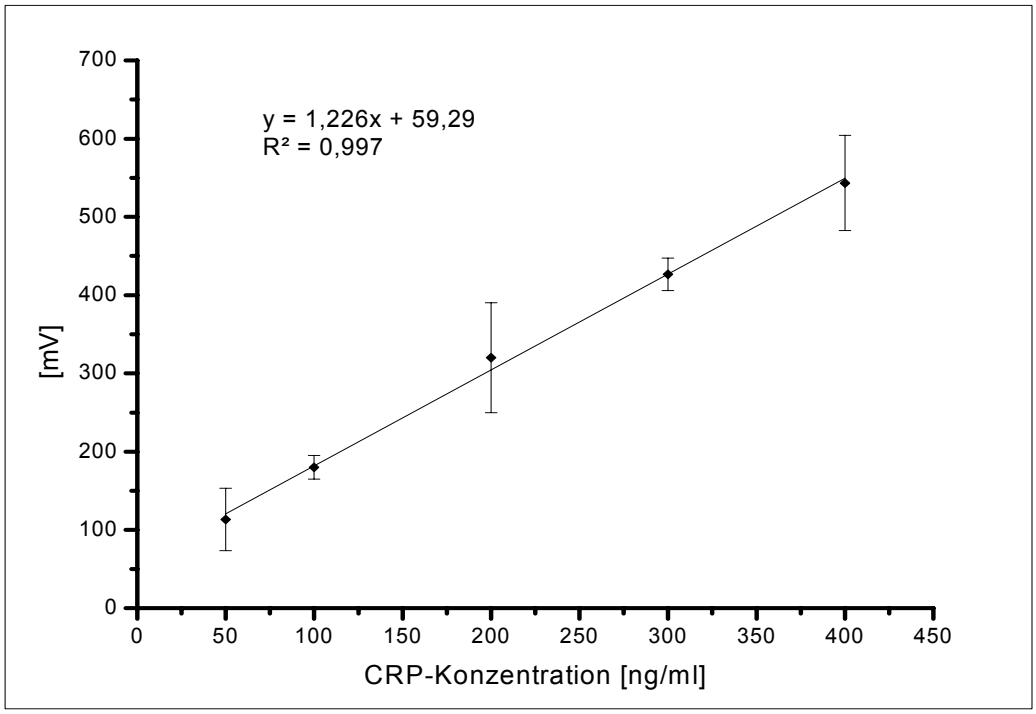


Abbildung 170 Linearer Messbereich des fluidischen CRP-Assays mit magnetischer Extraktion aus Kaninchenserum. (n=3)

Man erkennt einen linearen Messbereich von 50-400 ng CRP pro ml. Das Probenvolumen betrug 500 µl. Insbesondere bei niedrigen Analyt-Konzentrationen steigen die Standardabweichungen wieder relativ stark an. Insgesamt sind die erzielbaren Signale aber geringer als beim Assay ohne magnetische Extraktion.

Zur Bestimmung der Standardabweichung und Verlässlichkeit dieses fluidischen Detektionssystems wurde ein Intra-Assay durchgeführt. Hierzu wurden vier verschiedene CRP-Probenkonzentrationen von 0 ng/ml (Blindwert), 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml jeweils 12-mal bestimmt. Tabelle 40 zeigt die Ergebnisse des Intra-Assays.

Tabelle 40 Bestimmung der Standardabweichung des CRP-Detektionssystems mit magnetischer Extraktion in Kaninchenserum.

Konzentration CRP [ng/ml]	Standardabweichung [%]
0 ng/ml (Blindwert)	13,5 %
100 ng/ml	4,2 %
250 ng/ml	5,6%
500 ng/ml	3,1 %
Gesamt	**6,6 %**

Die ermittelten Standardabweichungen sind gerade im niedrigen und mittleren Konzentrationsbereich deutlich höher als bei höheren Konzentrationen. Die Standardabweichung des Blindwertes von 13,5 % ist auch bei diesem Assay für einen immunodiagnostischen Tests sehr hoch. Die Gesamtstandardabweichung von 6,6 % des gesamten Systems ist aber akzeptabel.

4 Diskussion

4.1 Etablierung eines Biosensors zur Analytik des C-reaktiven Proteins auf Basis der Oberflächenplasmonresonanz

Die in dieser Messanordnung verwendeten Antikörper antiCRP C2 und antiCRP C6 wurden vom Hersteller als ideale Antikörper-Kombination für Sandwich-Arrangements angeboten. Daher bot sich der Einsatz dieser beiden Antikörper zur Detektion des humanen C-reaktiven Proteins (CRP) an.
Gleichzeitig sollte diese SPR-basierte Messanordnung als Testlauf für die Detektion von CRP mit Magnetic Beads dienen. Die Optimierungsschritte dieses Assay wurden daher auch auf die magnetische Detektion ausgelegt.
Das wichtigste Element einer Immunodetektion ist der Antikörper. Da die SPR eine markierungsfreie Messmethode darstellt, konnte der Detektionsantikörper antiCRP C2 ohne weitere Modifikation nativ eingesetzt werden. Seine Anlagerung als zweiter Antikörper an aus der Probe extrahiertes und präsentiertes CRP stellt den größten Signalzuwachs und somit die bestimmbare Größe dieses Assays dar.
Zur Extraktion und Präsentation des CRP war die Immobilisierung des ersten Sandwich-Partners an der Chip-Oberfläche notwendig. Aufgrund der zusätzlichen Betrachtung von Magnetic Beads mit einer Streptavidinoberfläche wurde eine Streptavidin-Biotin-Kopplung zur Immobilisierung verwendet. Die Affinität von Biotin (Vitamin H) zum bakteriellen Streptavidin ist sehr hoch und führt zu einer extrem stabilen Verbindung. Streptavidin verfügt über insgesamt vier Biotin-Bindedomänen und dient somit als Multi-Linker.

Die Erzeugung einer Biotin-Schicht auf den verwendeten Goldchips erfolgte nach einer Methode von HARTMANN (2004) und resultiert in sehr gut einsetzbaren und lagerfähigen Biotin-Chips. Das verwendete Streptavidin band sehr gut an diese Biotin-Oberfläche und stellte danach die Immobilisierungsoberfläche für den biotinylierten Antikörper antiCRP C6 dar. Die Anlagerung des Streptavidins an die Biotin-Oberfläche lässt sich in Abb. 40 sehr gut online verfolgen, wie auch die Anlagerung des biotinylierten Antikörpers. Bei den Waschschritten nach jeder Reagenzienzugabe konnte kein Auswaschen der

immobilisierten Moleküle in Form eines Signalabfalls festgestellt werden. Dies spricht für die extrem stabile Biotin-Streptavidin-Bindung.

Die Biotinylierung eines Antikörpers ist ein kritischer Vorgang. Durch die Markierung des Antikörpers mit einem zusätzlichen Molekül kann die Struktur und Funktion des Antikörpers nachhaltig beeinflusst werden. Bei diesem Assay wurden zwei verschiedene Immobilisierungsmethoden miteinander verglichen (vgl. Kap. 2.9). Zum einen die Biotinylierung an Aminogruppen und die Biotinylierung an Carboxylgruppen.

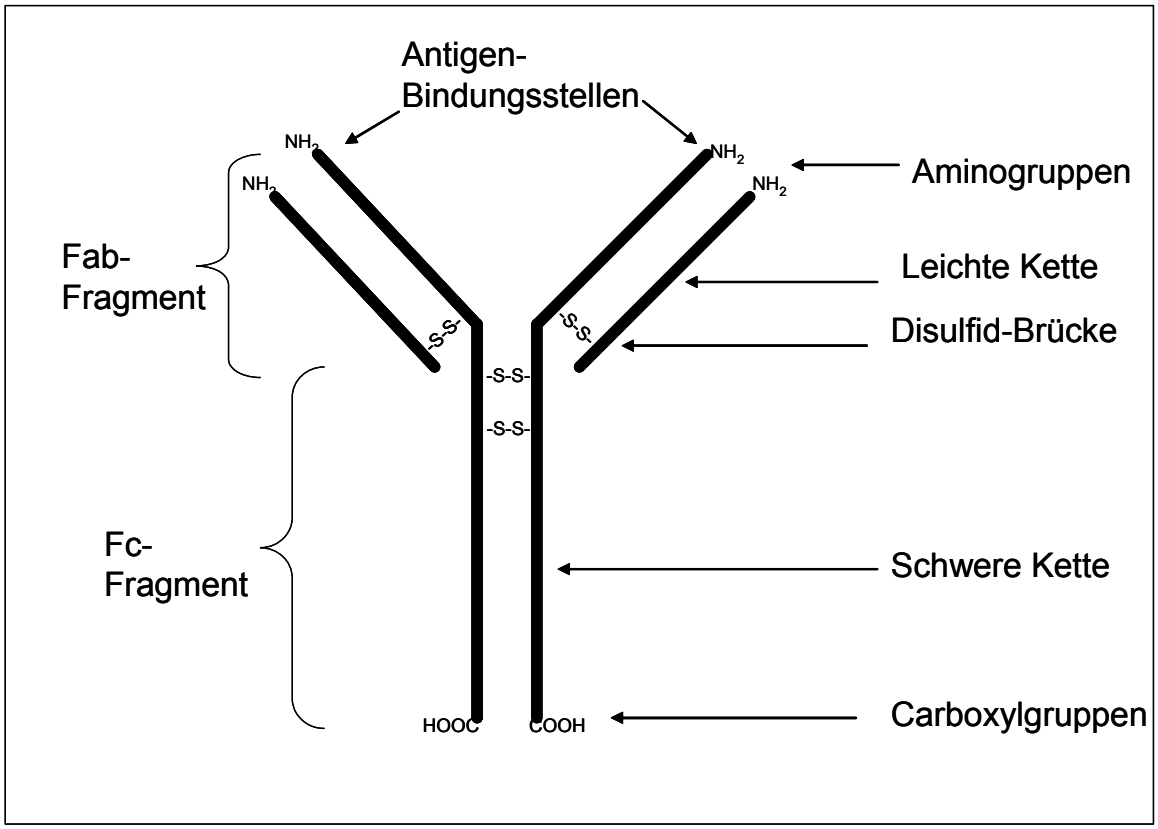


Abbildung 171 Schematische Darstellung eines Antikörpers.

Prinzipiell verfügt jede Proteinkette eines Antikörpers über einen Carboxyl- und einen Amino-Terminus. Zusätzliche Amino- und Carboxylgruppen im Antikörpermolekül stammen von den Aminosäureresten. Hier sind insbesondere die Aminosäuren Lysin, Asparagin, Glutamin und Arginin mit Aminogruppen zu nennen. Die Aminosäure Lysin ist durch ihren langen Rest mit endständiger Aminogruppe hier vielleicht am wichtigsten. Typische Aminosäuren mit Carboxylgruppen sind Aspartat und Glutamat.

Durch die strukturelle Anordnung von Aminogruppen an den Antikörper-Bindungsdomänen ist es möglich, dass der Antikörper durch eine Biotinylierung an diesen Bereichen nachhaltig geschädigt oder sogar inaktiv wird.
In Betrachtung der Biotinylierung an Carboxylgruppen scheint dies sinnvoller, da die zu biotinylierenden Carboxylgruppen nicht an den Antigenbindungsdomänen liegen (vgl. Abb. 171).
Zusätzliche Biotinylierungen an freien Aminosäureresten sind natürlich ebenfalls möglich. Da die genaue Lage der jeweils möglichen Aminosäuren im Antikörper aber nicht bekannt ist, muss eine strukturelle Beurteilung ausbleiben.

Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Immobilisierungsmethoden liegt in der finalen Ausrichtung des Antikörpers nach seiner Immobilisierung. Abbildung 172 gibt einen Überblick über die theoretisch möglichen Anlagerungen.

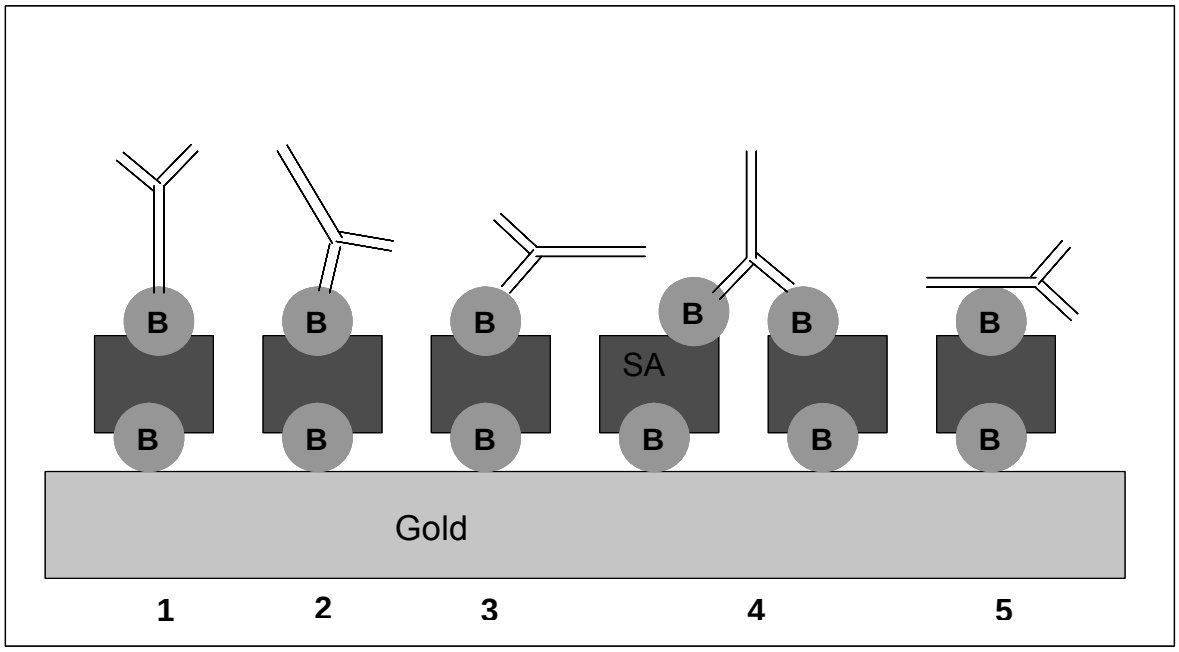


Abbildung 172 **Schematische Darstellung der Ausrichtung nach Immobilisierung.** (B = Biotinylierung. SA = Streptavidin)

Die linke Immobilisierung (1) wäre ein Beispiel mit einer Biotinylierung an Carboxylgruppen des Fc-Fragments. In diesem Fall wäre der Antikörper frei zugänglich und kann beide Bindungsdomänen einsetzen. Die Beispiele 2 und 3 sind möglich bei einer Biotinylierung an Aminogruppen und führen zu einer schlechteren Zugänglichkeit des Antikörpers und dem zusätzlichen Verlust einer Bindungsdomäne. Beispiel vier ist

ebenfalls nach einer Biotinylierung an Aminogruppen möglich und zeigt zwar eine erfolgreiche Immobilisierung, aber auch einen inaktiven Antikörper. Beispiel 5 wäre möglich bei einer Immobilisierung an Carboxyl- oder Aminogruppen an freien Aminosäureresten. Der Antikörper ist zwar etwas schlechter zugänglich, aber aktiv.

Aus strukturellen Gründen und Vorteilen bei der Immobilisierung wäre daher eine Biotinylierung an Carboxylgruppen vorzuziehen. Wie in Abb. 41 zu erkennen, ist ein Carboxyl-biotinylierter Antikörper in seiner Funktion aber ca. 40 % schlechter als eine Biotinylierung an einer Amino-Gruppe. Eine mögliche Erklärung liegt in der Methode der Biotinylierung. Die Carboxyl-Biotinylierung nutzt eine Aktivierung der Carboxylgruppe mit EDC und koppelt unter Abspaltung des EDC ein Molekül mit Aminofunktion über eine Peptidbindung an die Carboxylgruppe. Hierzu wird Biotin mit einem Spacer und einer Aminofunktion eingesetzt (Biotin-$(PEO)_3$-Amin). In Anwesenheit von Wasser (wie z. B. im verwendeten MES-Puffer) kann es aber auch zu einer spontanen Spaltung der EDC-aktivierten Carboxylgruppe kommen; das EDC katalysiert dann keine Peptidbindung und die Carboxylgruppe liegt wieder frei vor. Hierdurch kommt es während der Reaktion zu einem Gleichgewicht zwischen aktivierten und freien Gruppen; das EDC wird bei Abspaltung inaktiv. Dies kann die Ausbeute an biotinylierten Molekülen verringern. Weiterhin wird EDC auch als Cross-Linker eingesetzt. Das heißt, als Molekül mit freier Aminogruppe kann nicht nur das Biotin-$(PEO)_3$-Amin dienen, sondern auch ein anderes Antikörper-Molekül (GRABAREK UND GERGELY, 1990). Hierdurch kommt es zu einem Cross-Linking von zwei oder mehr Antikörper-Molekülen. Diese werden hierdurch eventuell ebenfalls inaktiv, sind aber zumindest nicht biotinyliert.
Aufgrund der Ausbeute und Aktivität der biotinylierten Antikörper wurde die Amino-Biotinylierung weiterhin für alle markierten Antikörper eingesetzt.

Die Ermittlung der optimalen Antikörper-Konzentration wird bei den meisten Immunoassays durchgeführt. Prinzipiell muss ein idealer Kompromiss zwischen Oberflächenbeladung und Zugänglichkeit der Antikörper gefunden werden. Dieser sollte in einem optimalen Signal resultieren. Es ist nachvollziehbar, das geringe Antikörperkonzentrationen zu niedrigen Signalen führen. Sind nur wenige Antikörper vorhanden, so können eventuell nicht alle extrahierten und präsentierten Antigene abgedeckt werden. Eine Erhöhung der Antikörperkonzentration steigert somit das erreichbare Messsignal. Ab einer zu hohen Antikörperkonzentration kommt es zu

sterischen Hemmeffekten. Die Antikörper blockieren sich bei der Antigenbindung gegenseitig. Hierdurch bleiben wiederum Antigene unmarkiert und das optimal mögliche Signal wird nicht erreicht. In diesem Zusammenhang ist Abb. 42 zu sehen. Die optimale Antikörperkonzentration von 100 µg/ml in der Messküvette wurde empirisch als optimal ermittelt. Bei dieser Konzentration ist auch die Abweichung der doppelten Messungen voneinander am geringsten. Dies kann als eine optimale Sättigung des Assays mit Antikörpern ohne sterische Probleme interpretiert werden.

Prinzipiell sind auch alternative Immobilisierungsmöglichkeiten für antiCRP-Antikörper möglich. So nutzen HU ET AL. (2006) Protein G, welches sie über einen mit EDC gekoppelten NHS-Aktivester an Aminogruppen immobilisieren. Protein G bindet spezifisch an die Fc-Region von IgG-Molekülen. Hierdürch ist auch eine gerichtete Immobilisierung wie in Abb. 172 (Beispiel 1) möglich.
LEONARD ET AL. (2007) verwenden zur Immobilisierung eines CRP-spezifischen scFv-Antikörpers (homolog zu antiCRP) einen Biotin-Chip und immobilisieren einen biotinylierten Sekundärantikörper zur scFv-Bindung ebenfalls über Streptavidin. Die verwendete Antikörperkonzentration beträgt 50 µg/ml in einem SPR-Durchflusssystem. Diese relativ komplexe Form der Immobilisierung mit einem Sekundärantikörper ist ebenfalls eher ungerichtet, führt aber ebenfalls zu einer sensitiven Antikörperschicht.

Die Messergebnisse des CRP-Assays mit SPR-basierter Detektion zeigen eine sigmoide Abhängigkeit der Winkelveränderung von der eingesetzten CRP-Konzentration von 0,5-100 µg/ml CRP. Der pseudolineare Messbereich ist relativ eng (2-5 µg/ml), trifft dafür aber die typische CRP-Konzentration in humanem Blutserum am unteren Ende. Eine Detektion und Quantifizierung von humanem CRP in Puffer ist also möglich. Durch den niedrigen linearen Messbereich ist es möglich, Blutserumproben (normale CRP-Konzentration 0-50 µg/ml) in Puffer zu verdünnen und anschließend per SPR zu vermessen.

Bei einem ebenfalls SPR-basierten CRP-Biosensor von HU ET AL. (2006) konnte humanes CRP bei Konzentrationen von 1, 3, 10 und 26 µg/ml detektiert werden. Die ermittelten Signalhöhen zeigten eine Konzentrationsabhängigkeit. Ein linearer Messbereich wurde von den Autoren jedoch nicht ausgewiesen.

Durch den Einsatz von zwei verschiedenen antiCRP Antikörpern mit unterschiedlichen Epitopen im CRP-Pentamer wird die Detektion sehr spezifisch und Kreuzreaktionen praktisch ausgeschlossen. Prinzipiell muss man feststellen, das die erreichten Detektionsgrenzen mit ~1 µg/ml CRP relativ schlecht sind. Mehrere ELISA-basierte Systeme zur Detektion von humanem CRP wurden mit Detektionsgrenzen von 0,1 µg/ml beschrieben (BLACK ET AL., 2004). Die SPR-basierte Detektion ist aber durchaus sinnvoll, wenn z. B. die Detektion online und ohne zusätzliche Verstärkungsreaktion und Markierung verfolgt werden soll.
Zusätzlich dient dieser Assay als Test für die magnetische Detektion, die mit demselben immunologischen Nachweis etabliert werden sollte.

LEONARD ET AL. (2007) nutzten die SPR-basierte CRP-Detektion zur Evaluierung verschiedener Antikörper. Hierbei wurden K_D-Werte für CRP-sensitive Antikörper von 2,5 x 10^{-8} bis 4,3 x 10^{-10} M^{-1} gefunden. Der im Rahmen dieser Arbeit bestimmte K_D-Wert von 1,39 x 10^{-3} M^{-1} für den Antikörper antiCRP C2 ist deutlich höher. Dies bedeutet, dass der erhaltene Komplex instabiler ist. Ein gewisser Unterschied beider Methoden liegt im verwendeten CRP und der Auswertemethode. Das von LEONARD ET Al. (2007) verwendete CRP bestand aus Monomeren und wurde hierfür aus Pentameren gespalten. Das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte CRP lag als Pentamer vor. Hierdurch ergibt sich eine deutlich erhöhte Anzahl von Epitopen pro Molekül. Durch mehrere gebundene Antikörper pro CRP-Molekül kann der gesamte Komplex bzw. jede einzelne Antikörper-Bindung auch durch sterische Konfrontationen instabiler werden.
Wahrscheinlicher ist jedoch ein Problem im Rahmen der Auswertemethode nach EDWARDS UND LEATHERBARROW. Normalerweise weisen Antikörper typische K_D-Werte von 10^{-7} bis 10^{-10} M^{-1} auf. Die Methode von EDWARDS UND LEATHERBARROW zur Berechnung des K_D-Wertes ist notwendig, da es sich bei dem Plasmonic® um ein Küvetten-basiertes SPR-System handelt. Eine Auswaschung des gebundenen Antikörpers im stetigen Pufferfluß ist dementsprechend nicht möglich und erfolgt durch sequentielle Waschschritte.
LEONARD ET Al. (2007) nutzten ein fluidisches SPR-System mit entsprechender Software zur Berechnung der K_D-Werte. In diesem Zusammenhang ist der gefundene K_D-Wert von 1,39 x 10^{-3} M^{-1} für den Antikörper antiCRP C2 als zu instabil bzw. Plasmonic®-gebunden zu bezeichnen. Bislang ist aber keine weitere Bestimmung dieses K_D-Wertes bekannt.

4.2 Immobilisierung des antiCRP Antikörpers Klon C2 auf Polystyrol

Die Immobilisierung des antiCRP C2 Antikörpers auf Polystyrol diente der Evaluierung verschiedener Immobilisierungstechniken. Die qualitative Beurteilung der Immobilisierung erfolgte durch die Boehringer Ingelheim microParts.

Bei einer Immobilisierung von Proteinen auf Polystyrol bietet sich oftmals eine adsorptive Beschichtung mit Selbstorganisation an. Das Verfahren wird z. B. auch beim beschichten von Mikrotiterplatten für ELISA-Assays verwendet. Mikrotiterplatten für ELISA-Anwendungen bestehen ebenfalls aus Polystyrol (z. B. HighBind-MTP von Nunc).
Hierbei nutzt man eine molekulare Eigenschaft des Polystyrols. Das polymerisierte Styrol verfügt über einen Benzolring mit konjugierten Doppelbindungen (vgl. Abb. 173).

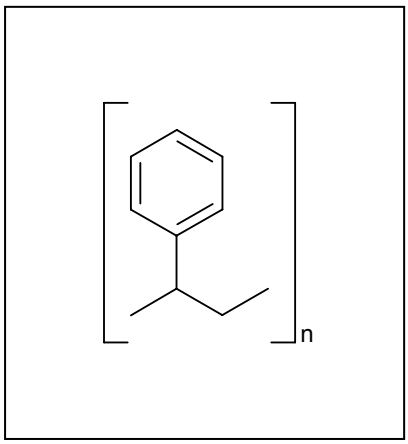


Abbildung 173 Schematische Darstellung von Polystyrol.

Bei einer Inkubation von Proteinen mit einer Polystyroloberfläche kommt es zu einer Interaktion des Benzolrings mit den Aminosäureresten aromatischer Aminosäuren. Typische Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten sind z. B. Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Hierbei kommt es zu einer Überlappung der π-Elektronensysteme beider Ringsysteme und somit zu einer Immobilisierung über van-der-Waals-Kräfte. Man bezeichnet diese Eigenschaft als „stacking“.
Die erhaltene Immobilisierung ist zwar nicht besonders stark, reicht aber für gängige immunologische Anforderungen wie z. B. ELISA aus. Diese Form der adsorptiven Beschichtung ist meistens sehr schonend, da die Konformation des Proteins kaum

beeinflusst wird. Allerdings liegt keine gerichtete Immobilisierung von z. B. Antikörpern vor. Abb. 174 zeigt einige mögliche Ausrichtungen von Antikörpern mit adsorptiver Beschichtung auf Polystyrol.

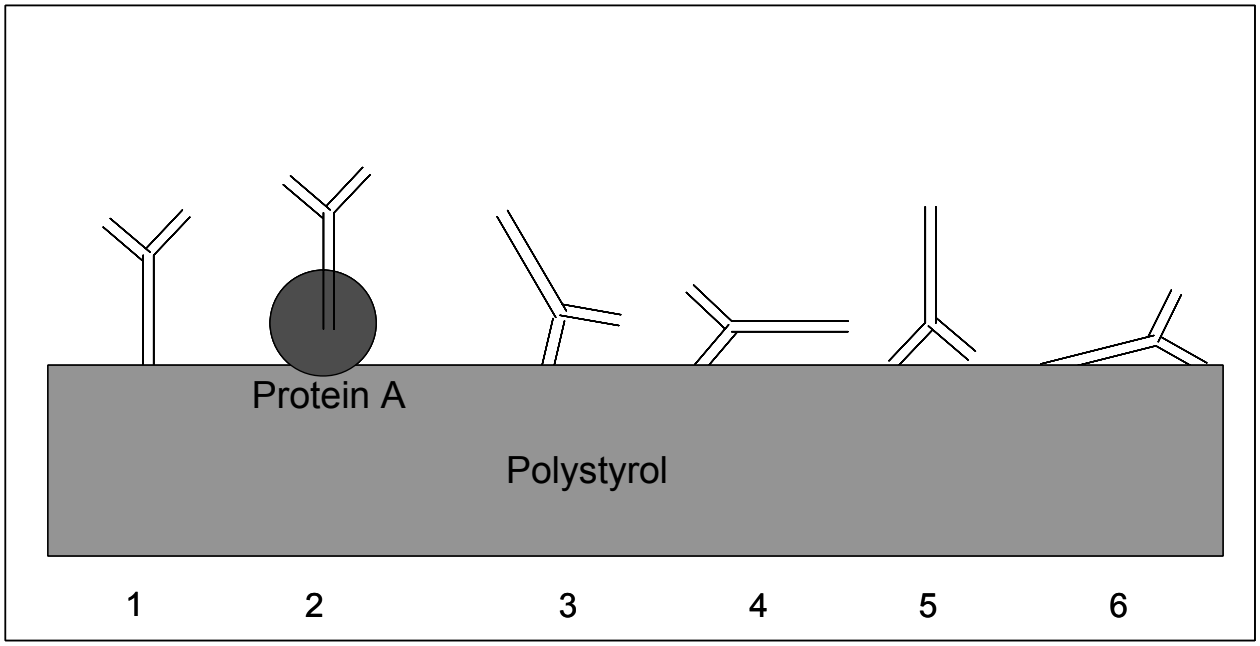


Abbildung 174 Schematische Darstellung verschiedener Antikörper-Ausrichtungen auf Polystyrol.

Ideal wäre eine Immobilisierung vom Typ 1. Dies ist aber zufallsbedingt eher unwahrscheinlich. Außer der zu immobilisierende Antikörper verfügt über besonders viele aromatische Aminosäuren am Fc-Carboxyl-Terminus. Da sich aromatische Aminosäuren aber eher im Bereich der Antigen-Bindungsdomänen befinden, sind die Varianten 3, 4 und 5 wahrscheinlicher. Während bei Typ 3 und 4 noch eine Antigenbindung bzw. Antikörperzugänglichkeit möglich ist, bedeutet Typ 5 die Inaktivierung des Antikörpers. Am wahrscheinlichsten bei adsorptiver Beschichtung ist Typ 6 (flach oder aufrecht), da hier der Kontakt zwischen Polystyrol und Antikörper am größten ist. Der Antikörper ist zwar eingeschränkt zugänglich, aber noch aktiv.
Eine Sonderform der adsorptiven Beschichtung ist Typ 2. Hier wird zuerst ein Antikörper-bindendes Protein wie z. B. Protein A oder Protein G adsorptiv immobilisiert. Hieran kann ein Antikörper gekoppelt werden. Da Protein A am Fc-Ende eines Antikörpers ansetzt, kann von einer gerichteten Immobilisierung ausgegangen werden.

Die adsorptiven Beschichtungen von Polystyrol stellten sich tatsächlich auch als die am besten geeignete Methode dar. Dies wird auch von QIAN ET AL. (2000) beschrieben.

Insbesondere bei einem auch für ELISA-Coatings verwendeten Carbonat-Puffer pH 8,5 konnten sehr gute Bindungsausbeuten erreicht werden. Die Trocknung der Chips führte anscheinend zu einer Schädigung der immobilisierten Antikörper. Durch den Verlust der Hydrathülle kann es zu Konformationsänderungen des Proteins und somit zu Aktivitätsverlusten kommen. Es wurden zwar kompatible Solute wie z. B. Saccharose zum Schutz der Antikörper eingesetzt; diese konnten die Aktivität der Antikörper aber nicht vollständig erhalten.
Eventuell hätte durch den Einsatz einer Gefriertrocknung in Verbindung mit kompatiblen Soluten eine Verringerung der Antikörper-Schädigung erreicht werden können (DRABER ET AL., 1997). Tatsächlich ist eine feuchte Lagerung des Antikörpers wahrscheinlich nur für wenige Wochen stabil, da hier mikrobielle Abbauprozesse und thermische Einflüsse einwirken.
Der Einsatz von Protein A erbrachte nicht den gewünschten Effekt der zusätzlichen Signalsteigerung durch gerichtete Immobilisierung. Tatsächlich war das erhaltene Signal sogar etwas geringer als nur bei adsorptiver Beschichtung. Eventuell verringert der zusätzliche Immobilisierungsschritt die Bindungsausbeute, oder die Protein A-Bindung ist nicht langzeitstabil. Als Alternative diskutieren KUMADA ET AL. (2006) den Einsatz spezieller Antikörper-Modifikation zur Erhöhung der Polystyrol-Affinität. Bei Einbringung dieser Tags am Fc-Ende eines Antikörpers ist eine gerichtete Immobilisierung ohne Protein A ebenfalls möglich. Diese Variante wurde aber aufgrund der sehr komplexen Einbringung eines solchen PS-Tags nicht weiter verfolgt.

Insgesamt muss man festhalten, dass jede Form von Immobilisierung einen Antikörper zumindest reversibel schädigt. Dies ist auch auf Polystyrol der Fall (BUTLER ET AL., 1992). Da der Antikörper aber für eine ortsgebundene Detektion immobilisiert werden muss, sind Aktivitätsverluste unabwendbar.

Neben einer adsorptiven Beschichtung sollten auch kovalente Kopplungsmethoden getestet werden. Die Kopplung über die in Kap. 2.8.6 beschriebene NHS/DCC-Kopplung oder GDA war nicht erfolgreich. Zur sinnvollen Nutzung von NHS/DCC oder GDA musste eine Amino-Oberfläche auf dem Polystyrol erzeugt werden. Polystyrol ist sehr empfindlich gegenüber organischen Lösungsmitteln und vertrug daher keine Nutzung von APTES in Aceton oder Dioxan. Als Alternative wurde APTES in Methanol und Millipore® eingesetzt. Da aber kaum Antikörper gebunden werden konnte, ist davon auszugehen, dass

die Erzeugung einer Amino-Oberfläche auf Polystyrol mit Methanol oder Millipore®-Wasser als Lösungsmittel nicht funktioniert hat. Die geringe Bindung von Antikörpern bei Methanol und Millipore®-basierter APTES-Beschichtung und feuchter Lagerung ist wahrscheinlich mit einer zusätzlich geringen adsorptiven Anlagerung des Antikörpers im finalen Immobilisierungsschritt begründbar.

Besser funktionierte die direkte Kopplung mit NHS/DCC und GDA nach einer Amino-Funktionalisierung der Polystyrol-Oberfläche mit Plasma. An die erhaltenen Aminogruppen kann der Antikörper ohne Einsatz organsicher Lösungsmittel gekoppelt werden. Die Immobilisierung mit GDA war etwas erfolgreicher. Diese Methode ist auch deutlich einfacher als die komplexe Kopplung mit NHS/DCC und führte daher vielleicht zu höheren Bindungsausbeuten. Eine gewisse Schichtdicke der Amino-Funktionalisierung war notwendig; bei dünneren Schichten verringerte sich auch die Bindungsausbeute. Dies deutet auch auf eine geringe Funktionalisierung der Oberfläche mit Aminogruppen hin. Eventuell hätte mit einer noch höheren Beladung auch eine höhere Beladungsdichte erreicht werden können. Es ist aber auch möglich, das die direkte Kopplung der Antikörper zu einer Konformationsänderung des Moleküls und somit zu einer Verschlechterung der Aktivität geführt hat. Dies ist insbesondere möglich, da hier wiederum auch über die an den Bindungsdomänen lokalisierten Aminogruppen immobilisiert wurde.

Als zusätzliche Alternative wurden die Photolinker FNPA und Sulfo-HSAB verwendet. Beide werden nur aufpipettiert und mithilfe von UV-Licht auf der Polystyrol-Oberfläche gebunden. Dies funktioniert auch auf anderen Polymeren. BORA ET AL. (2002) beschreiben den Einsatz solcher photoaktivierter Polytstyrol-Oberflächen.
Der Photolinker FNPA zeigte eine unerwartete Eigenfluoreszenz, was ihn zumindest für fluorimetrische Detektionsmethoden disqualifiziert. Der Photolinker Sulfo-HSAB zeigte relativ gute Ergebnisse, auch aufgrund seiner einfachen Anwendbarkeit. Bei der Trocknung dieser Proben zeigte sich wiederum der negative Effekt der trockenen Lagerung auf die Antikörper-Aktivität.

Insgesamt erscheint die adsorptive Beschichtung aufgrund ihrer simplen Durchführbarkeit und guten Ausbeute als geeignete Immobilisierungstechnik. Auch der Einsatz von Sulfo-HSAB ist sinnvoll, während die Verwendung von erfolgreich getesteten plasmafunktionalisierten Chips aus ökonomischen Gründen eher nicht sinnvoll ist.

4.3 Versuche zur Detektion von Mycoplasma paratuberculosis LAM

Die Detektion des *Mycobacterium paratuberculosis* LAM wurde wie die Detektion des humanen CRP in einem Sandwich-Verfahren getestet. Hierzu erfolgte die Immobilisierung des biotinylierten Extraktionsantikörpers anti-LAM_B ebenfalls per Biotin-Streptavidin-Kopplung.
Die durchgeführte SPR-Messung dieses Messprinzips zeigte weder eine Anlagerung von LAM, noch eine Anlagerung des Detektionsantikörpers anti-LAM an eventuell extrahiertes und präsentiertes LAM.

Die nicht-detektierbare Anlagerung von LAM kann über die Größe des Moleküls begründet werden. Kleine Moleküle wie ein Lipoarabinomannan sind in der SPR nur bedingt sichtbar. Gerade daher nutzt man oftmals eine Detektion im Sandwich-Prinzip zur Markierung und Visualisierung des Analyten. Die nicht-detektierbare Anlagerung des Markierungsantikörpers spricht aber tatsächlich für eine fehlende Interaktion. Der zugegebene anti-LAM Antikörper zur Markierung bindet in dieser Messanordnung nicht an eventuell gebundenes LAM.

Bei dem verwendeten anti-LAM Antikörper handelt es sich um ein IgM-Molekül. Diese bestehen aus 5 IgG-ähnlichen Einheiten, die miteinander am Fc-Abschnitt verbunden sind (vgl. Abb. 3). Es bestand also die Möglichkeit, dass der Antikörper durch eine Biotinylierung an Aminogruppen negativ beeinflusst wurde. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ebenfalls ein Sandwich-Prinzip getestet. In diesem Fall waren aber beide Antikörper nicht biotinyliert; der Extraktionsantikörper wurde über eine C18-Interaktion mit hydrophoben Wechselwirkungen immobilisiert. Eine Beeinflussung der Antikörper-Aktivität durch Modifikationen kann also ausgeschlossen werden.

Im SPR-Sensogramm dieser Messung (Abb. 51) sieht man sehr gut die Anlagerung des ersten Antikörpers an die C18-Oberfläche; beim nachfolgenden Spülen mit Puffer wird keine Abnahme des Signals beobachtet. Die Immobilisierung des Moleküls hat dementsprechend funktioniert. Eine nachhaltige Anlagerung von LAM konnte erneut nicht beobachtet werden; dies kann wiederum über die Molekülgröße erklärt werden. Der nachfolgend zugegebene anti-LAM Antikörper bindet ebenfalls nicht an eventuell

extrahiertes und präsentiertes LAM. Es findet also keine Interaktion zwischen LAM und anti-LAM statt.

Als weitere Option wurde das Sandwich-Messprinzip mit zwei identischen Antikörpern zur Extraktion und Markierung verworfen. Eventuell richtet sich der Antikörper gegen ein Epitop des LAM, welches nur 1-mal vorkommt. In diesem Fall kann zwar ein Antikörper an das LAM binden, ein zweiter aber nicht. Da die Funktion des Antikörpers vom Hersteller bestätigt wurde, ist diese Erklärungsmöglichkeit relativ wahrscheinlich.

Als Alternative wurde ein zweiter Antikörper zur Extraktion und Präsentation von LAM aus einer Probe eingesetzt. Da keine Antikörper gegen das *M. paratuberculosis* LAM kommerziell erhältlich waren, wurde auf einen Antikörper gegen *M. tuberculosis* LAM zurückgegriffen. Dieser sollte laut Hersteller eine Kreuzspezifität gegenüber *M. paratuberculosis* LAM aufweisen.
In der Evaluierung dieses Systems zeigte sich, dass eine geringfügige Anlagerung von LAM und des Markierungsantikörpers anti-LAM detektierbar war. Die Kontrolle ohne Zugabe von LAM zeigte keine Anlagerung von anti-LAM.
Die erreichten Anlagerungen sind aber für die Etablierung eines SPR-basierten Detektionssystems deutlich zu gering. Eventuell ist die Kreuzspezifität des verwendeten anti-MT Antikörpers gegenüber dem *M. paratuberculosis* LAM sehr gering.
Zusätzlich war die Konzentration des für diesen Versuch eingesetzten LAM mit 300 µg/ml extrem hoch. Es kann daher auch sein, dass über unspezifische Anlagerung des LAM an die möglicherweise nicht komplett blockierte C18-Oberfläche des Chips eine Verfälschung des Ergebnisses hervorgerufen wurde. In diesem Fall wäre die Extraktion des LAM unspezifisch und auch die Markierung mit anti-LAM nicht zur Detektion von LAM aus einer Probe geeignet.

Die Detektion von LAM mit einem immunologischen Sandwich-Prinzip konnte daher nicht realisiert werden.

In der Literatur werden verschiedene Testsysteme zur Detektion von *M. paratuberculosis* beschrieben. Die sensitivsten Systeme sind PCR-basiert. Hier wird die Detektion von 100 Zellen pro ml in Fäzes (COOK UND BRITT, 2007) und sogar 10 Zellen pro ml in Milch (STRATMANN ET AL., 2002) beschrieben.

Auch immunologische Systeme zur Detektion von *M. paratuberculosis* wurden bereits beschrieben. Hierbei handelt es sich aber um einen Nachweis zur Detektion eines Antikörpers gegen *M. paratuberculosis* bzw. gegen LAM. Hierzu wird LAM im ELISA als Extraktionsmolekül immobilisiert und eingesetzt; extrahierte Antikörper aus der Probe werden anschließend mit tierspezifischen Antikörpern markiert.
Solche Assays wurden z. B. von JARK ET AL. (1997) und WINTERHOFF ET AL. (2002) in Rinderserum und Verkaufsmilch beschrieben. Auch die Detektion des LAM in Rohmilch ist möglich (BEYERBACH ET AL., 2003). Diese ELISAs sind außerdem zur klinischen Diagnose in Deutschland zugelassen. MUNJAL ET AL. (2004) beschreiben die Evaluierung dieser ELISAs neben Rindern auch für Schafe und Ziegen und konnten somit ganze Herden klassifizieren.

4.4 Magnetische Detektion des C-reaktiven Proteins mit ABICAP®-Säulen

4.4.1 Vorversuche zur Optimierung der magnetischen Detektion

Nach der erfolgreichen Etbalierung eines immunologischen Detektionssystems für das C-reaktive Protein auf SPR-Basis sollte dieser Assay auf Basis der magnetischen Detektion mit Induktionsspulen übertragen werden. Ein kritischer Punkt jeder Detektion ist sicherlich das jeweils zu detektierende Element, in diesem Fall die als Markierungsmolekül eingesetzten Magnetic Beads.
Einige Arbeitsgruppen auf dem Gebiet der magnetischen Detektion verwenden in Eigenproduktion hergestellte Magnetic Beads und entwickeln diese immer weiter auf ihre spezifischen Anforderungen hin (KRIZ ET AL., 1996; KRIZ ET AL., 1998 und KRIZ ET AL., 2005). BASELT ET AL. (1998) erkannten bereits bei der ersten Beschreibung ihres späteren BARC-Sensors (GMR) die Notwendigkeit von Magnetic Beads mit speziell auf den jeweiligen Sensortyp abgestimmten Eigenschaften und der qualitativ gleich bleibenden Zugänglichkeit der Partikel.
Im Rahmen der magnetischen Detektion ist insbesondere die Gleichmäßigkeit der Partikel in Bezug auf Magnetitgehalt, Größe und Oberflächenbeschichtung relevant. Insofern unterscheiden sich die Anforderungen der magnetischen Detektion beträchtlich von den meisten Partikel zur Verwendung im Rahmen der weit verbreiteten magnetischen

Extraktion, deren Entwicklung zumeist nur auf eine maximale Beladungsdichte bzw. Extraktionsleistung der Partikel gerichtet ist (SAFARIK UND SAFARIKOVA, 2004).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Magnetic Beads des Kooperationspartners chemagen GmbH wurden ursprünglich für magnetische Extraktionen entwickelt; im Rahmen des Bio-M-Care Forschungsprojektes konnte aber eine Anpassung an die Anforderungen der magnetischen Detektion erreicht werden.
Dies wird beispielsweise in der Verwendung unterschiedlicher Kopplungsreaktionen des Strepatavidins auf der Polyvinyloberfläche der Magnetic Beads deutlich. Die primär verwendeten Partikel SAV2 und SAV1 lagerten sich anscheinend durch Interaktionen der nicht komplett mit Streptavidin abgesättigten Polymeroberfläche zu größeren Partikeln zusammen. Diese konnten die Poren der PE-Sinterkörper nicht mehr passieren und führten somit zu den sehr hohen Blindwerten der Messungen (Messwert ohne Analyt).
Die alternativ eingesetzten Partikel Typ SAV1 (NCO) mit einer modifizierten Kopplungsmethode des Streptavidin über Isothiocyanat anstelle des vorher standardmäßig verwendeten Carboxyl-Aktivesters konnte die Zusammenlagerung der Magnetic Beads zu größeren Partikeln unterdrückt werden (vgl. Tab. 20) und reduzierte somit auch die Blindwerte bei Einsatz dieser Partikel.
Der in Abbildung 56 gezeigte Vergleich der Magnetic Beads nach Durchführung von Probemessungen mit dem CRP-System zeigte einen maximalen Signalunterschied zwischen Messwert und Blindwert (ohne Analyt) bei Verwendung einer 1:100 (v/v) verdünnten Lösung von Magnetic Beads Typ SAV1 (NCO). Höhere Verdünnungen zeigten aufgrund des geringeren Partikelgehaltes entsprechend geringere Signalzuwächse.
Die Verwendung der größeren Magnetic Beads Typ SAV2 (NCO) mit einer Größe von 1-3 µm (im Unterschied dazu Typ SAV1 (NVO): 0,5-1 µm) brachte erstaunlicherweise trotz der größeren Partikel uns somit des größeren Magnetitgehaltes zwar höhere Bruttosignale, nach Abzug des Blindwertes war der gemessene Signalzuwachs aber geringer als bei Verwendung der Magnetic Beads Typ SAV1 (NCO).
Dies kann z. B. durch sterische Interaktionsprobleme der größeren Partikel um die kleinen Analytproteine und somit einer reduzierten Bindungsausbeute bedingt sein.

Weiterhin wurden Magnetic Beads der Hersteller Merck Estapor und Senova mit einem Durchmesser von jeweils 200 nm getestet. Beide zeigten Signale, die aber deutlich schlechter als die chemagen-Partikel auf der gleichen Verdünnungsstufe waren. Die

Senova-Partikel eigneten sich erst ab deutlich höheren Konzentrationen. Die zusätzlich getesteten Partikel des Herstellers chemagen mit Durchmessern von 100 nm und 10 nm ergaben beide überhaupt kein Signal.
Hier kann eine Korrelation der Magnetic Bead-Größe und der erreichbaren Signale hergestellt werden. Unterstellt man eine Kugelform, so reduziert sich das Volumen des Partikels bei einer Halbierung des Durchmessers um den Faktor 8. Dementsprechend steht bei gleichmäßiger Verteilung des Magnetits bei einer Halbierung des Partikeldurchmessers nur ein Achtel des detektierbaren Magnetits zur Verfügung und das maximal erreichbare Detektionssignal nimmt ab.

In Abbildung 56 sind die Mess- und Blindwerte der Partikel SAV1 mit Carboxyl- oder Isothiocyanat-Immobilisierung des Streptavidins dargestellt. Man erkennt deutlich höhere Signale für Mess- und Blindwert bei den Standard-Partikeln SAV1 (COOH). Die Partikel SAV1 (NCO) haben nur ca. die Hälfte des Messwertsignals, aber der Anteil des Blindwertes am Gesamtsignal ist deutlich geringer. Die Magnetic Beads Typ SAV1 (NCO) zeigten dementsprechend eine deutlich geringere Bindungsausbeute, aber auch eine geringere unspezifische Interaktion mit dem PE-Sinterkörper. Eventuell ist die Isothiocyanat-Kopplung nicht so effizient wie die Carboxyl-Kopplung des Streptavidins. Das Verhältnis zwischen Mess- und Blindwert konnte durch Abtrennung größerer Magnetic Beads-Partikel per Filtration durch Streptavidin-beladene und BSA-blockierte PE-Sinterkörper reduziert werden. Die zusätzliche Verwendung von Caseinpuffer mit den Magnetic Beads führte letztendlich zum besten Verhältnis zwischen Mess- und Blindwert. Eventuell gab es bei den Magnetic Beads Typ SAV1 (NCO) noch reaktive Gruppen der Streptavidin-Beschichtung, die durch Verwendung von Casein abgesättigt werden konnten. Ein ähnlicher Effekt konnte bei der gleichen Behandlung der Magnetic Beads Typ SAV1 (COOH) beobachtet werden; die Reduzierung des Blindwertes war aber weniger signifikant. Wie in Abbildung 56 gut erkennbar führte die Filtrierung der Magnetic Beads durch die Streptavidin-BSA-Säulen zu einer starken Reduzierung der Signalhöhen. Gleichzeitig wurde ein großer Teil der Magnetic Beads auf den PE-Sinterkörpern der Streptavidin-BSA-Säulen zurückgehalten. Hierdurch standen bei dem anschließend durchgeführten Assay deutlich weniger Partikel für eine spezifische Interaktion zur Verfügung, was sich auch in einer Reduzierung der erreichbaren Signale auswirkte. Allerdings kann man davon ausgehen, dass die auf den Streptavidin-BSA-Säulen gebundenen Partikel auch auf den Messsäulen nur unspezifisch interagiert hätten und ihr

Anteil dem Blindwert zugerechnet werden muss. Der Verlust an „aktiv nutzbaren“ Partikeln dürfte dagegen gering gewesen sein. Gleichzeitig führt die Verwendung von Casein insbesondere bei den Magnetic Beads Typ SAV1 (NCO) zu einer starken Verringerung des Blindwertes, während der Messwert nur etwas abnimmt. Hier konnte durch die Verwendung von Casein also die spezifische Interaktion der Magnetic Beads mit dem Analyten eventuell etwas verbessert werden, da aufgrund der Absättigung reaktiver Restgruppen weniger Partikel unspezifisch sondern Antikörper-spezifisch binden konnten.

Als Alternative zur gut etablierten Biotin-Streptavidin-Kopplung der Detektionsmoleküle an die Magnetic Beads wurden auch Direktkonjugate zwischen Antikörper und Magnetic Beads getestet (FUENTES ET AL., 2004). Die Magnetic Beads wurden hierfür bereits vom Hersteller chemagen GmbH mit reaktiven Gruppen zur direkten Kopplung ausgestattet. In Verbindung der Anwendung mit PE-Sinterkörpern waren die Immobilisierungsmethoden über Isothiocyanat- und Carboxyl-Kopplung praktikabel. Die Kopplung über Amino- und Aldehydgruppen zeigten eine sehr hohe unspezifische Bindung an die PE-Sinterkörper. Insgesamt waren die erreichbaren Signale aber deutlich geringer als bei Verwendung der Biotin-Streptavidin-Kopplung.

Einen zusätzlichen Nachteil der Biotin-Streptavidin-Immobilisierung stellt die Notwendigkeit und Position des Biotin-Motivs dar. Wie bereits in Kap. 4.1 angeführt, kann die Biotinylierung des Antikörpers an Aminogruppen zu einer Beeinträchtigung der Funktion führen. Bei einem Einsatz mit Magnetic Beads kann es zusätzlich zu sterischen Zugänglichkeitsproblemen der Bindungsdomänen kommen.

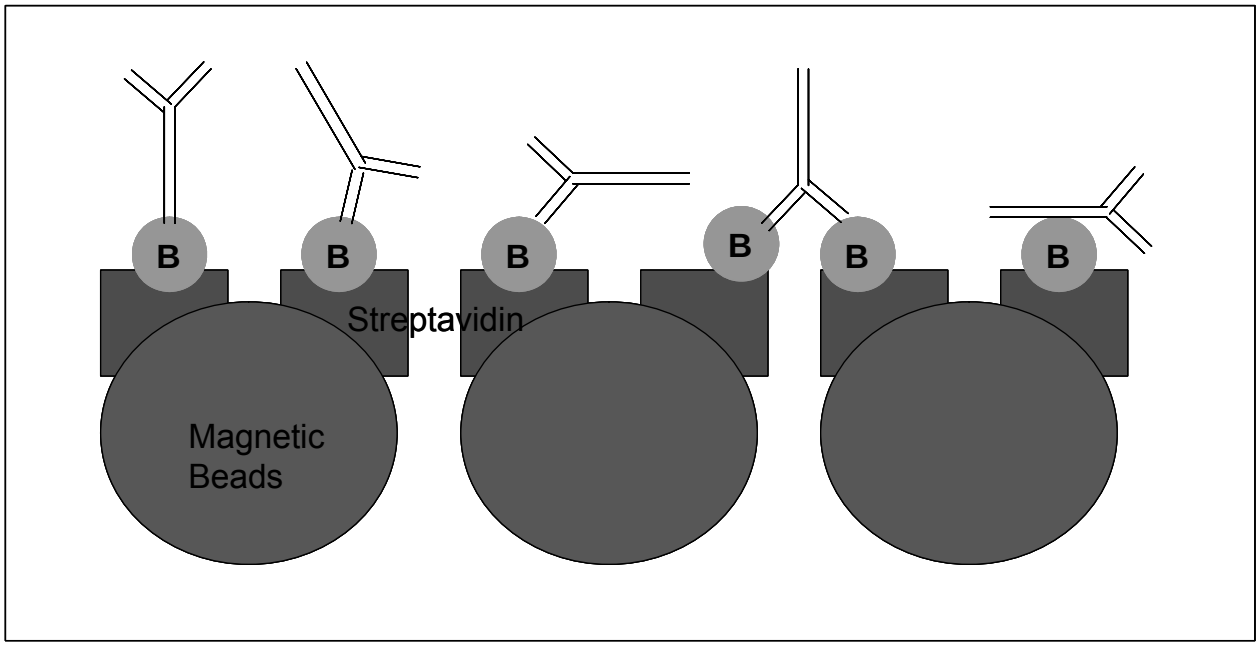


Abbildung 175 Schematische Darstellung verschiedener Immobilisierungspositionen von biotinylierten Antikörpern an Magnetic Beads.

Während die linke Darstellung wieder der Idealfall der Immobilisierung mit optimaler Zugänglichkeit der Bindungsdomaänen des Antikörpers darstellt, kann es auch zur Kopplung des Antikörpers an die Streptavidin-Beschichtung der Magnetic Beads in schlechter zugänglichen Positionen kommen. Auch eine Quervernetzung der Magnetic Beads mit mehrmals biotinylierten Magnetic Beads ist möglich.

Zusammenfassend wurde ein deutlicherVorteil der Magnetic Beads Typ SAV1 (NCO) in einer Verdünnung von 1:100 (v/v) mit Biotin-Streptavidin-Kopplung der Antikörper festgestellt. Diese Partikel wurden dementsprechend hauptsächlich verwendet.

4.4.2 Etablierung eines Systems zur Detektion des C-reaktiven Proteins

Die magnetische Detektion des C-reaktiven Proteins erfolgte mit dem bereits in der SPR-basierten Detektion vorgestellten Antikörper-Sandwich-Verfahren (vgl. Abb. 57). Die Anordnung der Antikörper ist im Vergleich zur SPR-basierten Detektion vertauscht. Dies liegt in der erfolgreichen Biotinylierung des anti-CRP C6 Antikörpers begründet. Zur Kopplung an die Magnetic Beads war ein Biotin-Motiv notwendig und nach den positiven Ergebnissen mit dem biotinylierten Antikörper anti-CRP C6 wurde dieser zur Kopplung an

die Magnetic Beads verwendet. Zur Extraktion und Präsentation des Analyten aus der Probe wurde der zweite Antikörper, anti-CRP C2, an den PE-Sinterkörper der ABICAP®-Säule immobilisiert.

Im Zuge der Assay-Optimierung wurde die Immobilisierung des Extraktionsantikörpers anti-CRP C2 an die PE-Oberfläche der Sinterkörper untersucht. Hierbei wurde die in Kap. 2.8.6 beschriebene NHS/DCC-Kopplung mit einem Aktivester und eine adsorptive Immobilisierung per Selbstorganisation getestet.
Die NHS/DCC-Kopplung von Antikörpern an PE-Sinterkörper wurde von DEGENER (2004) mit einer H_2O_2-UV-Aktivierung der Polyethylenoberfläche durchgeführt. Hierbei ist davon auszugehen, das das UV-Licht nur eine sehr geringe Eindringtiefe in die Oberfläche bzw. Poren des PE-Sinterkörpers erreicht. Alternativ wurden PE-Sinterkörper mit einer H_2O_2-Dampfbehandlung getestet, wobei H_2O_2-Konzentrationen von 3 und 9,8 % verwendet wurden. Wie in Abb. 58 zu erkennen, führt die Vorbehandlung der PE-Sinterkörper mit dampfförmigen H_2O_2 tatsächlich zu einer Steigerung der erreichbaren Signale, was mit einer gewünschten Erhöhung der Bindungsausbeute des anti-CRP C2 Antikörpers begründet werden kann. Die höhere H_2O_2-Konzentration von 9,8 % steigert das Signal im Vergleich zur Probe mit 3 % H_2O_2 nochmals. Dies zeigt, dass eine Behandlung der PE-Sinterkörper allein mit UV-Licht in einer H_2O_2-Lösung zur Aktivierung des gesamten PE-Sinterkörpers nicht ausreicht; es wurden allenfalls die Außenbereiche aktiviert.
Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist die Signalhöhe bzw. Bindungsausbeute der Kontrollprobe ohne jegliche H_2O_2-Aktivierung. Diese Signale sind unerwartet hoch. Bei den Konzentrationen 333 und 666 ng/ml CRP sind diese zwar geringer als die der H_2O_2-Dampf-Aktivierung, bei der höchsten Konzentration von 1000 ng/ml CRP Kontrollprobe aber sogar höher. Durch die fehlende Einführung von Hydroxyl-Gruppen an die Oberfläche des Polyethylen, kann es kaum zu einer Bildung des gewünschten Aktivesters über die NHS/DCC-Kopplung gekommen sein. Die trotzdem stattfindene Immobilisierung des Extraktionsantikörpers anti-CRP C2 erfolgte also unspezifisch per adsorptiver Selbstorganisation an der PE-Oberfläche. Dies kann bedeuten, dass die gesamte H_2O_2-Dampf-Aktivierung und NHS/DCC-Kopplung nur einen Teil der erreichten Immobilisierung des Extraktionsantikörpers bedingt, ein weiterer Teil basiert eventuell nur auf zufälliger adsorptiver Selbstorganisation.

In diesem Zusammenhang wurde auch die planmäßige adsorptive Selbstorganistaion des anti-CRP C2 Antikörpers mit guten Ergebnissen getestet. Hierbei handelt es sich um eine relativ simple und wenig steuerbare Immobilisierungstechnik. Im Vergleich zu einer kovalenten oder ionischen Kopplung kann es leichter zu Auswaschungen des immobilisierten Antikörpers kommen, auch die Lagerstabilität der immobilisierten Antikörper hängt stark von den strukturellen Eigenschaften des Antikörpers ab. Auch die Position bzw. Ausrichtung des immobilisierten Antikörpers kann nicht beeinflusst werden (vgl. Abb. 175).

Als optimaler Immobilisierungspuffer für adsorptive Selbstorganisation auf PE-Sinterkörpern wurde ein 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,5 identifiziert. Dies entpricht auch den Beobachtungen von DEGENER (2004) und HARTMANN (2004). Tatsächlich wird dieser Puffer auch bei gängigen ELISA-Coatings zur Immobilisierung auf Polystyrol und anderen Polymeren eingesetzt.
Weiterhin wurde die Lagerstabilität der adsorptiven Beschichtung analysiert. Hierbei ergab sich eine Schwankung der Messwerte im Rahmen der Standardabweichung innerhalb von vier Wochen (vgl. Abb. 60). Erst danach war ein Abfall des Signals feststellbar. Das heißt, eine adsorptive Beschichtung ist zumindest für 2-4 Wochen bei 4°C ohne einen signifikanten Verlust an Antikörper-Aktivität lagerbar.
Ein positiven Einfluss auf die Lagerbarkeit kann auch durch die Verwendung von Bronidox als Puffer-Konservierungsmittel ausgegangen sein. Hierdurch wird ein mikrobieller Befall und somit eine Degradation der immobilisierten Antikörper durch kontaminelle Proteasen reduziert.

Die Variation der Extraktions- und Detektionsantikörperkonzentrationen ergab ein Signaloptimum bei einer Extraktionsantikörper (anti-CRP C2)-Konzentration von 15 µg/Säule und von 5 µg/Säule des Detektionsantikörpers anti-CRP $C6_B$. Das geringere Antikörperkonzentrationen zu geringeren Signalen führen, lässt sich relativ plausibel aus der geringeren Zahl an möglichen Antigen-Bindungsstellen herleiten. Der Signalabfall bei höheren Antikörperkonzentrationen ist wahrscheinlich ebenfalls sterisch bedingt. Sowohl an der Oberfläche des PE-Sinterkörper als auch bei der Beladung der Magnetic Beads mit Antikörpern gibt es ein strukturelles Optimum der Antikörperverteilung und der Zugänglichkeit ihrer Bindungsdomänen. Wird die Konzentration über diesen Punkt erhöht,

blockieren sich die Antikörper gegenseitig durch Überlappung, Abschirmung und Verdrängung von der Oberfläche.
Als letzter Optimierungsschritt wurde der allgemeine Messpuffer des Assays variiert. Es zeigte sich ein deutlicher Vorteil des 0,15 M PBS-Puffers pH 7,3. Hierbei handelt es sich um einen weit verbreiteten physiologischen Puffer, der für viele immunologische Anwendungen eingesetzt wird, unter anderem für ELISA-Tests. Seine sehr gute Verwendbarkeit mit Antikörpern ist hinlänglich bekannt.

Die Durchführung einer Kalibration zur Detektion von CRP in PBS-Puffer ergab einen sigmoiden Zusammenhang zwischen Signal und CRP-Konzentration.
Es konnten zwei annähernd lineare Bereiche der sigmoiden Kurve als linearer Messbereich identifiziert werden. Der Messbereich für niedrige CRP-Konzentrationen von 5-125 ng CRP/ml zeigt hierbei überlappende Standardabweichungen der Einzelwerte und hängt maßgeblich vom Rauschverhalten des Sensors ab. Trotzdem kann dieser Messbereich mit der entsprechenden Beachtung der Nähe zum Detektionslimit für CRP-Detektionen verwendet werden. Der höhere Messbereich von 125-1750 ng CRP/ml zeigt eine bessere Trennung der Einzelwerte und erlaubt eine sichere Quantifizierung von CRP. Bei beiden ist die Linearität der Ausgleichsgerade mit 0,998 bzw. 0,994 sehr gut.
Der Intra-Assay der CRP-Detektion in PBS-Puffer zeigte relativ hohe Standardabweichungen von 9,4 % und 10,5 % beim Blindwert (Probe ohne Analyt) und beim niedrigen Messwert (50 ng/ml). Diese Beobachtung deckte sich mit den bestimmten Standardabweichungen des linearen Messbereiches für niedrige Analytkonzentrationen. Bei den höheren Messwerten des Intra-Assays sank die Standardabweichung deutlich auf 5,9 % (250 ng/ml) und 4,6 % (2500 ng/ml). Die jeweilige absolute Standardabweichung bei diesen Messwerten blieb ungefähr immer gleich, aber das jeweilige Signal stieg aufgrund der höheren CRP-Konzentration an und hierdurch wurde der prozentuale Anteil der Standardabweichung am Messwert deutlich geringer.
Die durchschnittliche Standardabweichung von 7,6 % ist trotzdem ein Maß für die hohe Genauigkeit des Systems. WU (2000) bezeichnet Standardabweichungen von bis zu 10 % für immunodiagnostische Tests für akzeptabel.

Die magnetische Extraktion stellt eine Weiterentwicklung der magnetischen Detektionsmethode dar. Durch die gleichzeitige Inkubation des Analyten mit Magnetic Beads und biotinyliertem Antikörper in der Probe entfällt die sequentielle Messmethode.

Stattdessen wird unter deutlicher Zeitersparnis der, sofern vorhandene, Analyt in der Probe an ein Antikörper-Magnetic Bead-Konjugat gebunden und mithilfe eines Magneten aus der Probenmatrix extrahiert. Die extrahierten Partikel wurden wieder in definierter Pufferlösung resuspendiert und anschließend einfach über die ABICAP®-Säule gegeben. Der Vorteil dieser Probenhandhabung liegt neben der Zeitersparnis auch in dem geringen Arbeitsaufwand und der Unabhängigkeit von der Probenmatrix. Zur Testung der Einsatzfähigkeit der kombinierten magnetischen Extraktion und Detektion wurde CRP aus einer PBS-Matrix extrahiert und anschließend wieder in PBS-Puffer vermessen.

Die durchgeführte kleine Kalibrationsreihe zeigte deutlich höhere Signale im Vergleich zur sequentiellen Messmethode und höhere Standardabweichungen der Einzelwerte. Der untersuchte Detektionsbereich entsprach in etwa dem niedrigen linearen Detektionsbereich der sequentiellen Messung in PBS-Puffer. Die Steigung der Ausgleichsgerade ist bei der magnetischen Extraktionsmethode ebenfalls deutlich.
Bei der kombinierten magnetischen Extraktion und Detektion wurden keine filtrierten Beads verwendet. Vorversuche zeigten, dass die Affinität der Partikel an die PE-Sinterkörper bei magnetischer Extraktion geringer war. Dementsprechend konnte auf eine vorherige Filtration verzichtet werden. Durch den Einsatz nicht filtrierter Partikel stand dementsprechend eine höhere Partikelkonzentration in der Probe zur Verfügung. Außerdem konnten in der Probe immer noch höher aggregierte Partikel aus Magnetic Beads vorliegen, die unspezifisch mit dem PE-Sinterkörper interagieren. Dies kann ein Grund für die erhöhte Standardabweichung der Einzelwerte sein. Zusätzlich ist auch ein gewisser inhomogener Materialverlust der Einzelproben bei der magnetischen Extraktion bzw. Resuspendierung denkbar. Auch dies würde sich in weiter auseinander liegenden Einzelwerten ausdrücken.

Gleichzeitig war die Kontaktzeit zwischen CRP und Antikörper-Magnetic Bead-Konjugat bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten deutlich länger als bei der Kontaktzeit der sequentiellen Messung von nur 1-2 Minuten der Flüssigkeitspassage durch die ABICAP®-Säule. Hierdurch kann es auch zu einer höheren Anzahl von gebildeten Analyt-Antikörper-Magnetic Bead-Konjugaten gekommen sein, welche in der Detektion zu höheren Signalen im Vergleich zur sequentiellen Detektionsmethode führen.
Insgesamt konnte die Anwendbarkeit der kombinierten magnetischen Extraktion und Detektion gezeigt werden.

4.4.3 Übertragung des CRP-Detektionssystems auf Realmatrices

Diagnostisch interessant ist die Detektion und Quantifizierung des CRP in Realmatrices. Hier ist insbesondere die Matrix Blutserum als typische Probenmatrix zu nennen. Das verwendete Blutserum hatte einen natürlichen CRP-Gehalt von ca. 1 µg/ml. Alle bestimmten Konzentrationen wurden also zusätzlich zugesetzt und gemessen.
Die gemessene Kalibrationsreihen zur sequentiellen Detektion und per magnetischer Extraktion zeigten die Möglichkeit, CRP auch in humanem Blutserum zu detektieren und quantifizieren zu können.
Da es sich um Messungen von zusätzlich zugesetztem CRP handelt, sind die real detektierten CRP-Gehalte höher. Dies äußert sich in niedrigeren Steigungen der Ausgleichsgeraden und relativ hohen Werten für niedrige CRP-Konzentrationen. Die dargestellten Kalibrationsreihen sagen dementsprechend nur wenig über erreichbare Detektionsgrenzen aus; nur ein linearer Zusammenhang und somit eine Kalibrierbarkeit auf reale Proben kann abgeleitet werden.
Hierbei ist insbesondere die Methode der magnetischen Extraktion interessant. Das CRP kann einfach und schnell aus Blutserum extrahiert und dann ohne etwaige Matrixeffekte in PBS-Puffer vermessen werden.
Wie bei der magnetischen Extraktion aus PBS-Puffer beobachtet man auch bei der magnetischen Extraktion aus Blutserum deutlich höhere Signale und eine höhere Steigung der Ausgleichsgerade sowie höhere Standardabweichungen der Einzelwerte im Vergleich zur sequentiellen Detektionsmethode.

KRIZ ET AL. (2005) beschreiben eine CRP-Detektion mit Magnetic Beads und Induktionsspulen in Blut mit einem Detektionslimit von 200 ng/ml bei einer durchschnittlichen Standardabweichung von 11 %. Das System basiert auf der Sedimentation der sehr kleinen Magnetic Beads mit gebunden Analyten zur Detektionsfläche, während ungebundene Magnetic Beads ohne Analyt länger in Lösung bleiben. Sowohl die Detektionsgrenze des CRPs als auch die durchschnittliche Standardabweichung sind vergleichbar.
IBRAIMI ET AL. (2006) beschreiben einen Schnelltest zur CRP-Bestimmung, basierend auf diesem System. Mit einer Probe von 4 µl konnte innerhalb von 5,5 Minuten eine CRP-Bestimmung bis zu einer Konzentration von 3 µg/ml bei einer durchschnittlichen

Standardabweichung von 10,5 % erreicht werden. Dieses System ist zwar deutlich schneller und benötigt kleinere Probenvolumina als das vorgestellte System. Allerdings ist auch die Detektionsgrenze deutlich höher.

Im Vergleich zu gängigen ELISAs mit Detektionsgrenzen von 2 µg/ml (DOMINICI ET AL., 2004) ist das vorgestellte Detektionssystem mit Magnetic Beads deutlich sensitiver. Ein bedeutender Faktor ist auch die Dauer der Bestimmung. Typische ELISA-Tests benötigen mehrere Stunden zur Ausführung. Die magnetische Detektion dauert je nach Ausführung ca. 30-60 Minuten. Ein vergleichbares Detektionslimit wie die magnetische Detektion liefern die sogenannten high-sensitivity (hsCRP) ELISAs mit Detektionslimits von durchschnittlich 0,2 µg/ml (DOMINICI ET AL., 2004). Hier ist das vorgestellte System mit magnetischer Detektion immer noch um den Faktor 10 sensitiver.

Ein weiteres Detektionssystem mit Magnetic Beads von MIAO UND BARD (2004) nutzen die Partikel als Extraktionsplatform; die Detektion erfolgt per generierter Chemilumineszenz. Das System zeigte einen Messbereich von 0,01-10 µg CRP/ml in Blutserum. KUROSAWA ET AL. (2004) beschreiben eine QCM-Mikrowaage mit einem Detektionsbereich von 0,01-1000 ng/ml CRP in Blutserum. Ein Mikro-Cantilever-basiertes System von WEE ET AL. (2005) erreichte eine Detektionsgrenze von 100 ng/ml in Puffer.

Bei aller Sensitivitätssteigerung muss auch der Nutzen betrachtet werden. Alle vorgestellten Detektionssysteme decken den relevanten Detektionsbereich von 1-10 µg/ml gut ab oder sind deutlich sensitiver. Ein klinischer Alarmwert wird erst bei 50 µg/ml erreicht. Zur Detektion solch erhöhter CRP-Werte im Serum müssen die meisten Proben schon stark verdünnt werden.
Der Vorteil aller vorgestellten Systeme mit magnetischer Detektion gegenüber den alternativen Systemen ist die Robustheit und Einfachheit der Messdurchführung. Weder ELISA- noch Mikroarray, QCM- oder Cantilever-Systeme können ohne aufwendige Laborausrüstung eingesetzt werden. Für eine Point-of-Care Detektion von CRP sind aber robuste und einfache Systeme notwendig.

Als alternative Probenmatrices wurden Saliva und Urin getestet. Das zu detektierende CRP wurde dotiert. In beiden Matrices konnte eine Kalibrierbarkeit in einem linearen Messbereich von 25-500 ng CRP pro ml gezeigt werden.

CHRISTODOULIDES ET AL. (2005) konnten eine Detektion von CRP in Speichel mit einem fluoreszenz-basierten Mikroarray bis zu einer Detektionsgrenze von 10 pg/ml zeigen. Der verwendete Speichel musste hierfür aber 1:1000 (v/v) verdünnt werden. Im Gegensatz dazu kann die magnetische Detektion direkt in Speichel messen, ein negativer Einfluss dieser Probenmatrix wurde nicht festgestellt; allerdings lag die getestete Detektionsgrenze mit 25 ng/ml auch deutlich höher.
Eine Detektion von CRP kann vor allem zur Diagnose bei entzündlichen Prozessen der Harnleiter, Blase, Niere und Nierenbecken sinnvoll sein. Aufgrund der teilweise sehr unterschiedlichen Eigenschaften von Urin in Bezug auf Ionenstärke und pH-Wert muss aber die Vergleichbarkeit und pH-Führung solcher Proben beachtet und weiter untersucht werden.

4.4.4 Vergleich der Sensorsysteme

Der Vergleich des Prototyp-Sensors und des modifizierten Aufbaus ergab eine weitgehende Übereinstimmung der Sensorleistung. Die Detektionslimits (LOD) beider Sensoren lagen bei jeweils 5 ng CRP/ml.
Unterschiede zwischen den Sensoren liegen zum einen in der Steigung der Ausgleichsgeraden der linearen Messbereiche. Dies lässt sich sowohl bei dem niedrigen Detektionsbereich von 5-350 ng CRP/ml als auch noch deutlicher beim hohen Detektionsbereich von 250-1500 ng/ml feststellen. Da das tatsächlich von den Detektionsspulen aufgezeichnete Signal des Magnetisierungsverhaltens der Magnetic Beads eine sehr schwache Intensität hat, wird es durch elektronische Aufbereitung vom Hintergrundrauschen getrennt und amplifiziert. Der Faktor der Amplifizierung lässt sich hierbei elektronisch variieren. Wahrscheinlich wurde für den modifizierten Sensor bei der Herstellung ein anderer Amplifikationsfaktor als bei dem Prototyp-Sensor gewählt. Die Linearität der jeweiligen Ausgleichsgeraden ist aber immer vergleichbar gut.

Ein weiterer Unterschied besteht in der Standardabweichung der Einzelwerte und damit verbunden im Quantifikationslimit (LOQ), welches bei dem modifiziertem Sensor höher ist als beim Prototyp. Grund hierfür sind die leicht erhöhten Standardabweichungen der Einzelwerte und dementsprechend auch des Blindwertes.

Der Grund der höheren Standardabweichung der Einzelwerte wurde in der eigentlich zur Reduzierung der Standardabweichung verwendeten Aufzeichnung und Mittelwertbildung des Signals über 20 Messwerte (ca. 1 Minute) identifiziert.
Ursache hierfür ist ein Signalanstieg der Magnetic Beads-Probe über der Messdauer. Abbildung 176 zeigt eine Aufzeichnung des Signals einer Einzelprobe über eine längere Zeitdauer.

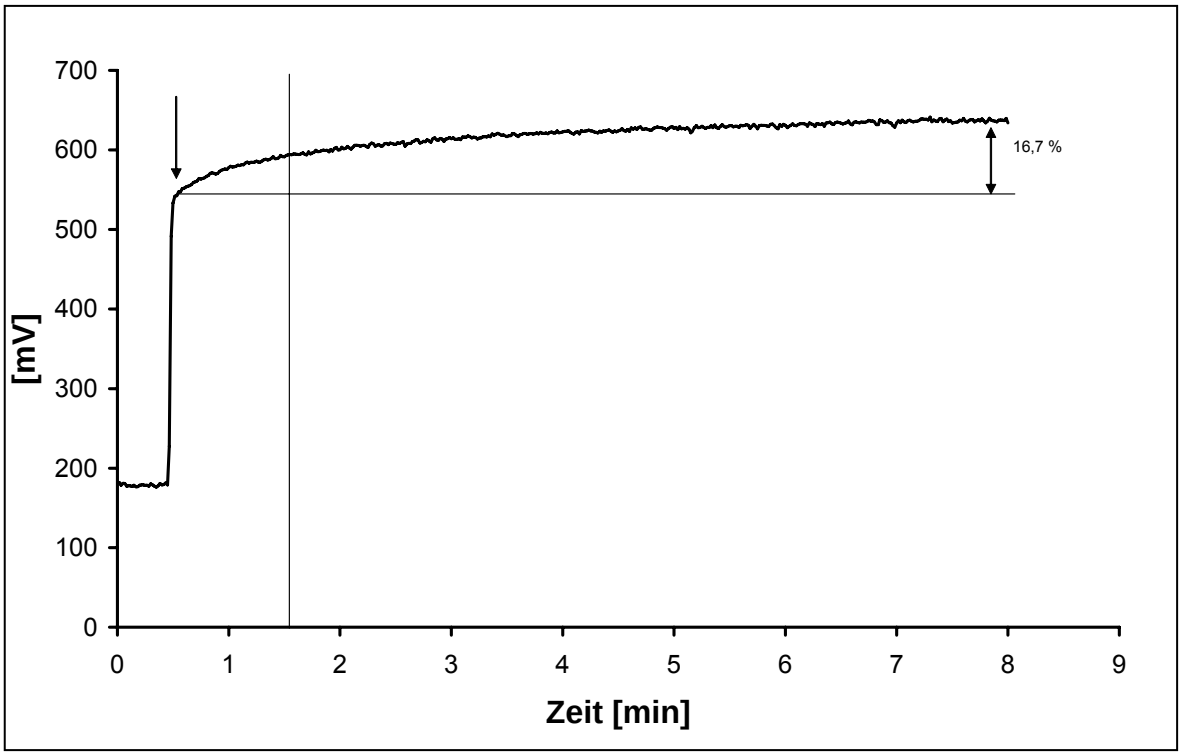
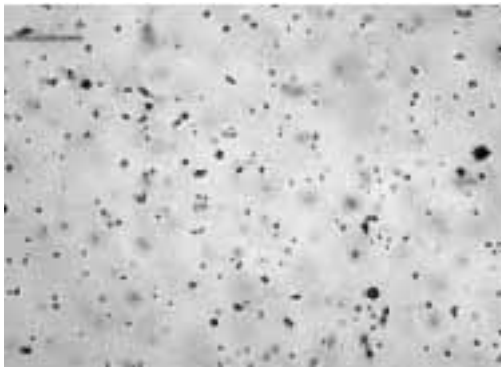


Abbildung 176 Graphische Darstellung der Signalsteigerung einer Einzelprobe.

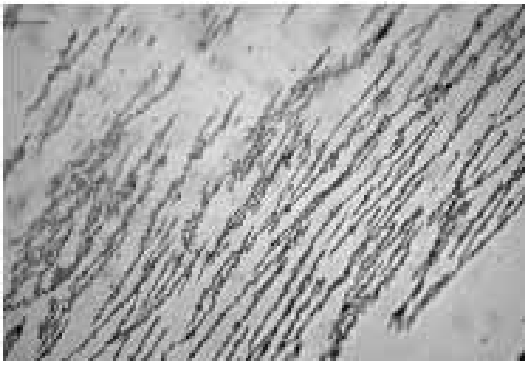
Man erkennt einen deutlichen Anstieg des Signals nach Einstellen der Probensäule in den Messkopf mit einem Signalanstieg von ca. 16,7 % über einem Zeitrahmen von 8 Minuten. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Prototyp-Sensor wurde der Messwert jeweils sofort nach Einstellen der Säule in den Messkopf abgelesen (Pfeil). Es wurde beobachtet, dass beim mehrmaligen Vermessen einer Probe der jeweilige Startwert (Pfeil) immer gleich hoch war. Erst über den Zeitverlauf der Messung zeigte die Probe einen mehr oder wenigen starken Anstieg des Signals. Wenn nun wie beim modifizierten Sensor eine Mittelwertbestimmung des gemessenen Signals über eine Minute erfolgt, so bestimmt man den Mittelwert in einer Phase des stärksten Signalanstiegs (zwischen Pfeil und senkrechter Linie). Wenn die Signalsteigerung der einzelnen Proben dann noch unterschiedliche Ausprägungen zeigt, so ist eine erhöhte Standardabweichung zwischen

den einzelnen Proben nachvollziehbar. Eine Reduktion der Signalaufzeichnungsphase auf wenige Sekunden würde die Standardabweichung hier deutlich reduzieren. Ein Sensititvitätsunterschied der einzelnen Sensoren besteht also nicht.

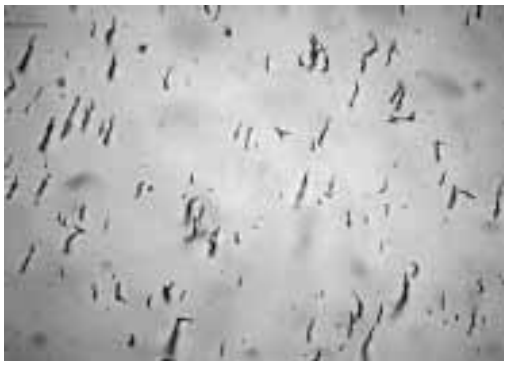
Die Ursache des Signalanstiegs der Probe ist unklar. Eine zuerst vermutete Erwärmung der Probe durch den aktiven Messkopf findet zwar statt, dies sollte aber physikalisch zu einer Verringerung des Signals führen. Wahrscheinlich mildert dieser Effekt, soweit messbar, den Signalanstieg sogar noch etwas ab.
In diesem Zusammenhang ist die von Dr. Matthias Stehr (GBF, Braunschweig) beobachtete Magnetisierung der Magnetic Beads während der Probe zu beachten.



Magnetic Beads (400-fache Vergrößerung)



Unter Einwirkung eines Magneten



Nach Entfernen des Magneten

Abbildung 177 **Magnetisierung von Magnetic Beads** (Bildquelle: Dr. Matthias Stehr, GBF, Braunschweig).

Man erkennt eine Magnetisierung der Magnetic Beads durch Anlegung eines Magneten; es bilden sich Ketten. Auch nach Entfernen des Magneten bleiben größere Komplexe aus Magnetic Beads vorhanden. Ob diese aus Gründen der magnetischen Anziehung oder aufgrund von Oberflächeninteraktionen aneinander haften, konnte nicht geklärt werden. Die wahrscheinlichere Variante ist aber eine nachhaltige Magnetisierung der Magnetic Beads. Dies sollte eigentlich aufgrund der super-paramagnetischen Eigenschaften des Magnetits nicht vorkommen. Jegliche Magnetisierung der Partikel sollte nach Abschalten des Magnetfeldes sofort verloren gehen.

Grund für diese Magnetisierung kann ein gewisser Anteil von Maghemit in den Magnetic Beads sein. Maghemit (Fe_2O_3) ist im Gegensatz zu Magnetit (Fe_3O_4) magnetisierbar. Das Auftreten von Maghemit kann zum einen beim Herstellungsprozess, aber auch sekundär durch lagerungsbedingte Oxidation des Magnetits vorkommen.

Eine Oxidation des Magnetits ist bei Magnetic Beads aber nur möglich, wenn die Magnetit-Kristalle nicht vollständig im PVA-Polymer gekapselt sind und somit durch im Lagerpuffer gelösten Luftsauerstoff oxidiert werden können.

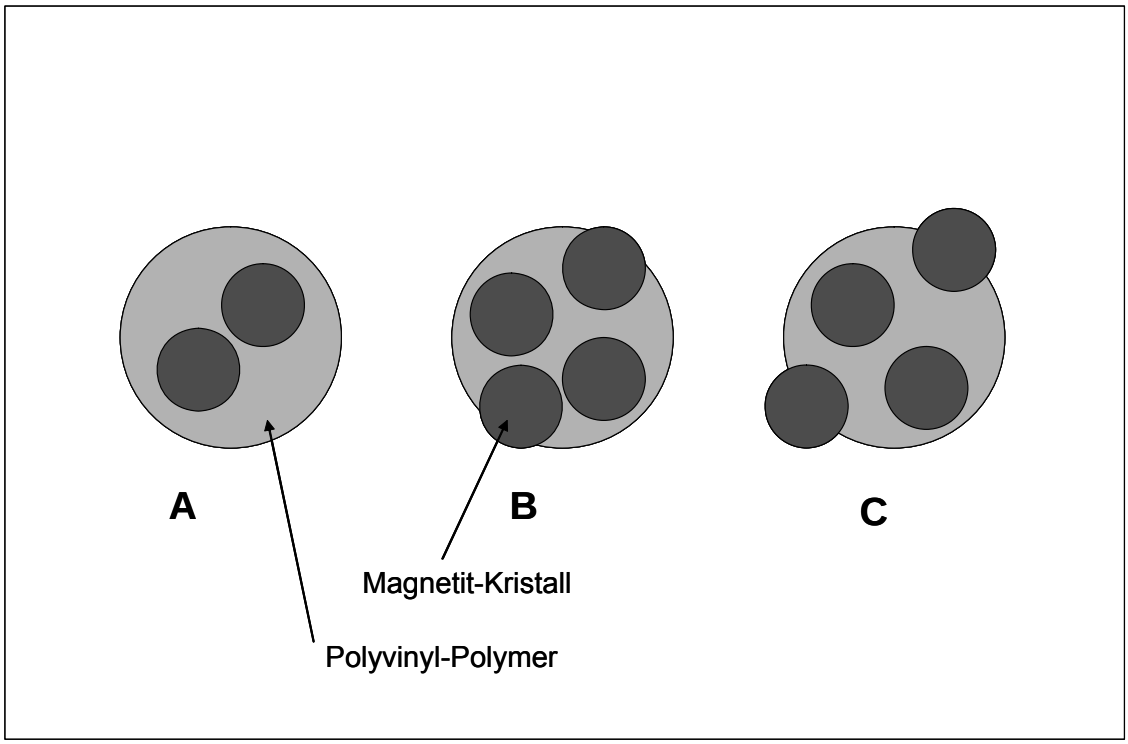


Abbildung 178 **Schematische Darstellung der Verteilung von Magnetit-Kristallen in einem PVA-Partikel.**

Betrachtet man die schematische Darstellung der Verteilung von Magnetit-Kristallen in einem PVA-Partikel, so ist dies ist z. B. bei Typ B und Typ C möglich. Bei Typ C ist die Oxidation aufgrund der höheren Exposition der Magnetit-Kristalle noch stärker möglich als bei Typ B.

Hier besteht ein herstellungsbedingter Nachteil der Magnetic Beads als Suspensions-Partikel. Würde man einen Magnetit-Kristall als Kern gezielt mit zusätzlichen Kapselungen bzw. Schichten versehen, so könnte eine Oxidation und somit Magnetisierbarkeit der Partikel reduziert werden.

Auf die magnetische Detektion dürfte ein solches Verfahren je nach verwendetem Partikel-Typ keinen negativen Einfluss aufweisen.

Als Beispiel wurde eine CRP-Kalibrationsreihe mit gekapselten Partikeln vermessen. Die Partikel wurden von Senova GmbH (Jena) bezogen. Die verwendeten Partikel hatten einen durschnittlichen Durchmesser von 0,2 µm und wurden zur Kompensierung der geringeren Größe im Vergleich zu chemagen-Partikeln nur 1:50 (v/v) verdünnt. Alle anderen Parameter des CRP-Assays wurden beibehalten, es wurde die magnetische Extraktion angewendet.

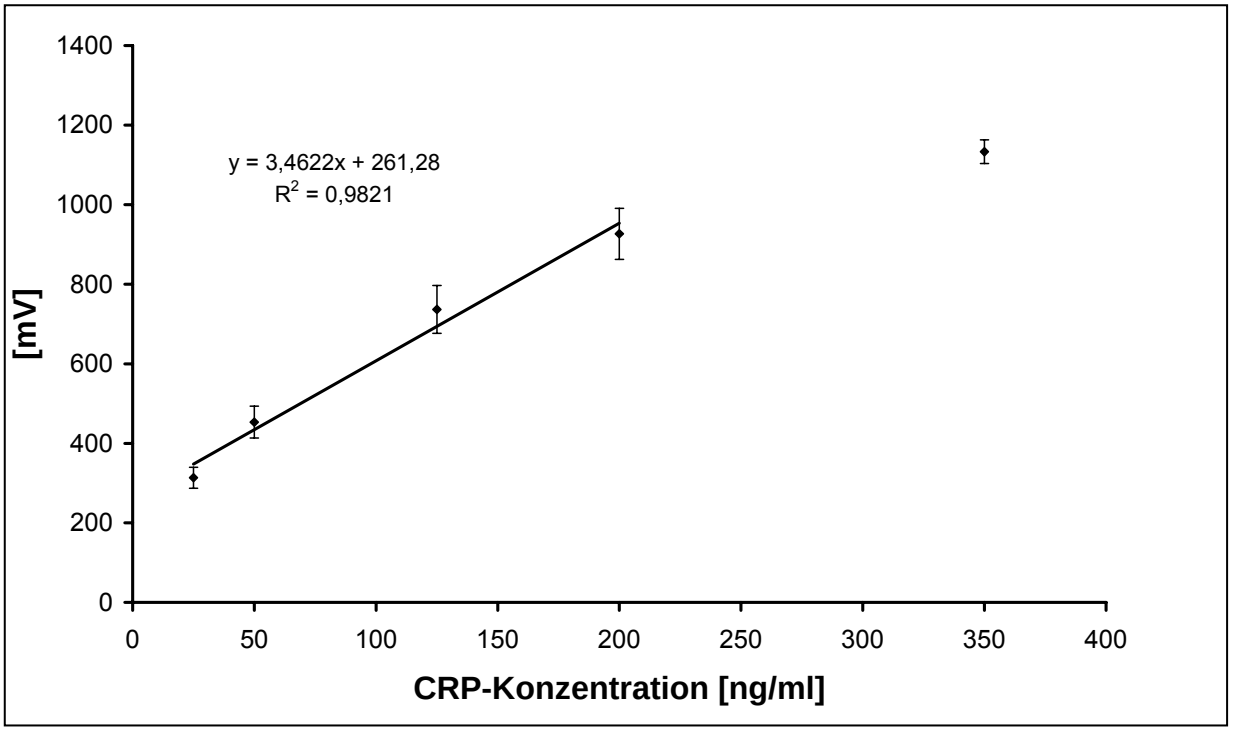


Abbildung 179 Kalibrationsreihe der magnetischen Extraktion von CRP mit Senova-Beads.

Man erkennt einen vergleichbaren linearen Messbereich und Linearität der Ausgleichsgerade wie bei der Verwendung von chemagen-Emulsionsbeads. Die Analyse des Signals über dem Zeitverlauf der Messung zeigt Abb. 180.

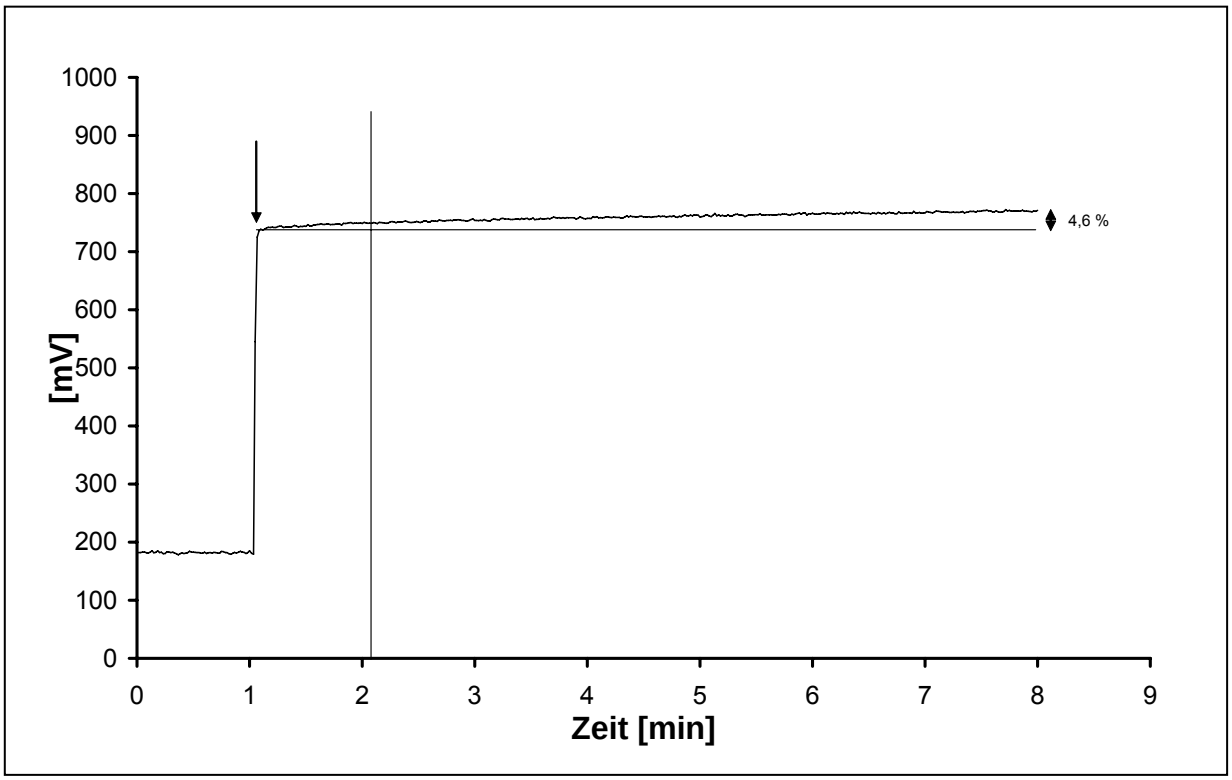


Abbildung 180 **Graphische Darstellung der Signalsteigerung einer Einzelprobe mit Senova-Beads.**

Man erkennt einen deutlich geringeren Anstieg der Signalhöhe von nur 4,6 % während der Messdauer und ungefähr gleicher Start-Signalhöhe bei der Verwendung von Senova-Beads im Vergleich zu Abb. 178 mit chemagen Beads. Nach einer Minute ist das Signal kaum gestiegen.

Nicht nur für die Verwendung des modifizierten Sensors, sondern auch für die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zukünftiger Anwendungen der magnetischen Detektion besteht hier also ein große Notwendigkeit der Produktion von nicht-magnetisierbaren Partikeln mit geeigneten Oberflächen-Immobilisierungstrategien.

4.5 Evaluierung alternativer Magnetpartikel

Die Evaluierung alternativer Magnetic Beads sollte eine Unabhängigkeit des Testssystems von speziellen Partikeln und gleichzeitig die Robustheit des immunolgischen Assays zeigen. Hierzu wurden Magnetic Beads verschiedener Hersteller einem Screening unterzogen und näher charakterisiert.

Auffällig ist der Einfluss der Oberflächenladung des Trägermaterials (PVA, Polyethylen, Polystyrol, Stärke) und der vom jeweiligen Hersteller verwendeten Kopplungsmethode des Streptavidins. Da die jeweilige Oberflächenladung bzw. Intensität der Ladung sowie die Kopplungsmethode des Ankermoleküls Streptavidin nicht eigenständig bestimmt werden konnte, wurden Informationen der Hersteller angefordert und kritisch ausgewertet.

Partikel mit starker Oberflächenladung und einer hydrophilen Oberfläche (Chemicell, Dynal C1) zeigten eine sehr starke unspezifische Affinität zum PE-Filter der ABICAP®-Säule und waren daher für spezifische Assays nicht brauchbar. Partikel mit einer neutralen Oberflächenladung (Estapor, Magnamedics, Dynal M-270) und einer aus der Kopplung des Streptavidins resultierenden, leicht hydrophoben Oberfläche (Dynal T1, Seradyn) waren dagegen gut geeignet.

In diesem Zusammenhang fiel der Dynal M-270 Magnetic Bead besonders auf. Bei einer Kalibration mit standardmäßig verwendetem Caseinpuffer ergaben sich sehr hohe Standardabweichungen der Einzelwerte. Ohne die Verwendung von Caseinpuffer konnten die Standardabweichungen der Einzelwerte signifikant reduziert werden. Dies spricht für eine zusätzliche Abschirmung bzw. Maskierung stark hydrophober Oberflächenladungen hin zu einem annähernd neutralen Bereich durch die Zugabe und Anlagerung von Casein auf die Oberfläche der Magnetic Beads bzw. eine Reduzierung der unspezifischen Bindung durch Belegung hydrophober Bereiche auf den PE-Filtern bei den meisten der verwendeten Magnetic Beads. Dies war bei dem Magnetic Bead Dynal M-270 aber kontraproduktiv.

Weiterhin zeigten sich teilweise deutliche Unterschiede der Partikel je nach eingesetzter Partikelgröße. Mit den im ersten Screening als brauchbar befundenen Magnetic Beads wurden anschließend Kalibrationen durchgeführt. Als ideale Alternative zum chemagen

Magnetic Bead wurde der Seradyn dsMGSA 1,3-Partikel identifiziert. Er stellte sich in einem nachfolgend durchgeführten Intra-Assay mit einem durchschnittlichen VK von ca. 4% als sehr gut dar und kann als brauchbare Alternative bezeichnet werden. Aber auch andere der verwendeten Magnetpartikel können nach einer entsprechenden Optimierung des Systems sicherlich sinnvoll eingesetzt werden.

4.6 Yersinia pestis-Assay mit magnetischer Detektion

Die Verwendung eines einzelnen Antikörpers gegen das *Y. pestis* F1-Antigen zur Extraktion und Präsentation des Analyten und zur Kopplung an die Magnetic Beads war aufgrund der Analyt-Struktur besonders sinnvoll. Das zu detektierende F1-Antigen besteht aus 7-14 homologen Protein-Untereinheiten (TITO ET AL., 2001). Es bietet somit eine Vielzahl von gleichen Epitopen und kann daher im Sandwich-Verfahren ohne sterische Hinderung und Epitop-Konkurrenz zwischen Extraktions- und Detektionsantikörper detektiert werden.

Der Vergleich verschiedener Strategien zur Immobilisierung des Extraktionsantikörpers anti-YP an der Oberfläche des PE-Sinterkörpers ergab einen klaren Nachteil der Photolinker. Hierbei war der in Methanol verwendete Photolinker FNPA sogar deutlich schlechter als der in wässrigen Lösungen anwendbare Photolinker Sulfo-HSAB. Dieser war in der Immobilisierung von Antikörpern auf Polystyrol positiv bewertet worden (vgl. Kap. 3.2). Ein Herstellungsnachteil kann hier in der UV-Beleuchtung zur Kopplung des Photolinkers an das Polyethylen liegen. Selbst bei einer gewissen Eindringtiefe des UV-Lichts in die Poren der Polyethylensinterkörper und rundum gleichmäßiger Beleuchtung kann der Photolinker im Inneren des PE-Zylinders (5 mm Durchmesser, 5 mm Höhe) nicht erfolgreich gekoppelt werden. Tatsächlich steht bei einer optimistischen Eindringtiefe des UV-Lichts von 0,5 mm von allen Seiten des Zylinders insgesamt nur 36 % des Volumens als Immobilisierungsvolumen zur Verfügung. Diese Methoden sind also nur für 2-dimensionale Beschichtungen gut geeignet.
Relativ gering ist auch die Immobilisierungsausbeute der kovalenten NHS/DCC-Methode. Der Aufbau einer komplexen Linkerstruktur mit endständigem Aktivester brachte im Vergleich zur relativ simplen GDA-Kopplung zwischen Aminogruppen ohne Linker keinerlei positiven Effekt. Auch die mögliche Quervernetzung von Antikörpern ohne PE-

Immobilisierung hatte auf die Immobilisierungsausbeute der GDA-Methode keinen negativen Einfluss.
Die erfolgreichste und simpelste Methode war wiederum die adsorptive Beschichtung per Selbstorganisation der Antikörper. Diese hat wie bereits in Kap. 4.4 erläutert zwar auch deutliche Nachteile hinsichtlich Ausrichtung der Antikörper-Bindungsdomänen und Stabilität der Immobilisierung, erscheint hier aber durchaus einsetzbar.
Sofern eine stabilere kovalente Kopplung der Antikörper je nach Anforderung benötigt wird, kann ebenfalls auf die einfach durchführbare GDA-Kopplung zurückgegriffen werden.

Die Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentrationen ergab eine ideale Konzentration des Extraktionsantikörpers anti-YP von 10 µg/Säule und des Detektionsantikörpers anti-YP_B von 5 µg/Säule. Höhere Konzentrationen führen in beiden Fällen wieder zu sinkenden Signalhöhen. Die Erklärung hierfür dürfte analog zu Kap. 4.4 in der gegenseitigen sterischen Behinderung der Detektionsmoleküle begründet liegen. Als optimaler Messpuffer wurde aufgrund der guten Ergebnisse aus Kap. 4.4 wiederum 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 eingesetzt.

Die Erstellung einer Kalibrationsreihe zur Detektion von YPF1-Antigen im Sandwich-Prinzip in PBS-Puffer ergab einen sigmoiden Zusammenhang zwischen Analyt-Konzentration und Signal. Der ermittelte lineare Messbereich reichte von 25-300 ng YPF1 pro ml PBS-Puffer. Die Linearität der Ausgleichsgerade ist mit 0,988 akzeptabel.
Hierbei entspricht 1 ng YPF1 ca. 100 cfu, wobei dies nur eine grobe Abschätzung darstellt. Die tatsächliche Menge an vorhandenem Oberflächenprotein YPF1 in einer Kultur hängt stark von den Medien- und Kulturbedingungen ab.
Der durchgeführte Intra-Assay resultierte in einer sehr guten Gesamt-Standardabweichung von 6,1 %. Hierbei waren die Standardabweichungen der niedrigen Konzentrationsstufe und des Blindwertes (ohne Analyt) wieder deutlich höher als die restlichen Konzentrationsstufen. Auch dieser Zusammenhang wurde bereits in Kap. 4.4 thematisiert und ist wahrscheinlich dem Standardabweichungs – Signalverhältnis zuzurechnen. Wenn die absolute Standardabweichung gleich bleibt und das Signal steigt, sinkt der prozentuale Anteil.

Auch die Detektion von YPF1-Antigen in humanem Blutserum per sequentieller Detektion funktionierte gut und vergleichbar zur Detektion in PBS-Puffer. Es wurde wieder ein sigmoider Zusammenhang festgestellt, aber die Standardabweichungen der Einzelwerte sind bei der Bestimmung in humanem Blutserum höher.
Als linearer Messbereich konnte ebenfalls ein Konzentrationsbereich von 25-300 ng YPF1 pro ml humanem Blutserum bestimmt werden. Allerdings ist hier die Linearität der Ausgleichsgeraden mit 0,974 schlechter als bei der Detektion in PBS-Puffer. Dies schlägt sich auch in einer schlechteren Gesamt-Standardabweichung von 7,5 % nieder.
Grund hierfür kann die komplexe Probenmatrix Blutserum sein. Durch den hohen Proteingehalt kann es zu Matrixeffekten und somit zu einer größeren Streuung der Einzelwerte kommen.
Mit der gezeigten Kalibrationsfähigkeit des Systems zur Detektion von YPF1 in Blutserum ist ein Einsatz zur Detektion in Realproben möglich. Hier bietet sich die Diagnose von Blutproben und Bubonenflüssigkeit an. Aus beiden Realmatrices müssten aber feste Bestandteile abgetrennt werden, da diese die PE-Sinterkörper nicht passieren können.

Die Detektion von YPF1-Antigen aus Kaninchenserum per magnetischer Extraktion stellt eine Beispielapplikation für die YPF1-Extraktion dar. Aufgrund der leichteren Zugänglichkeit wurde als Matrix Kaninchenserum verwendet. Die erzielten Ergebnisse sollten aber auf andere Serummatrices wie z. B. Mensch oder Wanderratte übertragbar sein. Eine Detektion wurde nur für den bereits beschriebenen linearen Detektionsbereich der sequentiellen Methode getestet. Auch bei der magnetischen Extraktion ergibt sich hier ein linearer Messbereich. Wie bereits bei der Detektion von CRP per magnetischer Extraktion festgestellt, ist auch hier die Signalhöhe erhöht. Dies kann analog zu Kap. 4.4 in der längeren Kontaktzeit zwischen Antikörper und YPF1 begründet sein.
Die Linearität der Ausgleichsgerade liegt mit 0,983 im gleichen Bereich wie bei der sequentiellen Messmethode.
Die relativ hohe Standardabweichung der Einzelwerte in Abb. 99 zeigte sich nur teilweise im durchgeführten Intra-Assay. Wie bereits bei vorherigen Intra-Assays sind die Standardabweichungen des Blindwertes (ohne Analyt) erhöht; die Gesamt-Standardabweichung von 6,4 % ist aber in Anbetracht der magnetischen Extraktion sehr gut.
Die Methode der magnetischen Extraktion bietet auch bei dieser Applikation für den Anwender mehrere Vorteile. Eine Extraktion und Detektion des YPF1 bzw. ganzer

Y. pestis-Zellen aus verschiedensten Probenmatrices erscheint möglich. Auch Proben mit festen Bestandteilen oder viskose Probeflüssigkeiten werden durch die Extraktion und Abtrennung unerwünschter Probenbestandteile zugänglich. Durch die robuste und kompakte Bauweise des Sensors scheinen auch diagnostische Einsätze außerhalb einer Laborumgebung möglich.

Die wahrscheinlich sensitivste Detektion von *Y. pestis* ermöglichen bislang die PCR-basierten Detektionssysteme. Die Nachweisgrenzen liegen teilweise bei unter 50 cfu/ml (SELVAPANDIYAN ET AL., 2005). Mit unter 1,5 Stunden ist das beschriebene System für eine PCR-basierte Methode auch erstaunlich schnell. Eine exakte Unterscheidung zwischen *Y. pestis* und anderen Yersinien bzw. Unterarten ist ebenfalls per PCR in einer Messung möglich (CHASE ET AL., 2005).
Ein direkter Bakteriennachweis über die Biolumiszenz genetisch modifizierter B-Zellen gelang RIDER ET AL. (2003) mit dem CANARY-Sensor (Cellular Analysis and Notification of Antigen Risks and Yields). Das Detektionslimit dieses sehr sensitiven Systems lag bei 50 cfu/ml. Der größte Nachteil des CANARY-Sensors liegt allerdings in seiner Laborabhängigkeit.

Deutlich weniger sensitiv sind immunologische Detektionsmethoden. Ein typisches System zum Nachweis einer Infektion mit *Y. pestis* beschreiben BIAGINI ET AL. (2005); hier werden Antikörper im Blut des Patienten detektiert. Es handelt sich dementsprechend um einen indirekten Nachweis.
Mehrere direkte Detektionssysteme mit Antikörpern richten sich gegen das YPF1-Kapselprotein oder das bereits beschriebene LcrV-Protein. Ein ELISA-basiertes System zur Detektion von YPF1 stellen SPLETTSTOESSER ET AL. (2004) mit einer Detektionsgrenze von 4 ng/ml vor. Ein weiterer ELISA zur Detektion des LcrV-Proteins mit einer Detektionsgrenze von 0,1 ng/ml wurde von GOMES-SOLECKI ET AL. (2005) vorgestellt.
Hierbei ist auf den Vorteil der YPF1-Detektion hinzuweisen. Im Gegensatz zum LcrV-Protein gibt es zwar YPF1-negative Varianten von *Y. pestis* (ANIMISOV ET AL., 2004); diese sind aber nicht letal. Das LcrV-Protein wird in der Wachstumsphase der Bakterien in das Umgebungsmedium sekretiert. Eine Detektion dieses Proteins ist per se nur ein indirekter Nachweis des Bakteriums. Das YPF1-Kapselprotein ist dagegen zwangsweise an die *Y. pestis*-Zelle gekoppelt.

Neben den relativ weit verbreiteten ELISA-Tests gibt es zahlreiche biosensorische Detektionssysteme. CAO ET AL. (1995) beschreiben einen Faseroptischen Sensor mit einer Detektionsgrenze von 5 ng/ml YPF1. Der lineare Detektionsbereich des Sensors erstreckt sich von 50-400 ng/ml YPF1. Diese Leistungsdaten sind vergleichbar zum vorgestellten System mit magnetischer Detektion.
Eine vergleichende Arbeit wurde von TOMASO ET AL. (2007) vorgestellt. Hierbei konnte eine sensitive und spezifische Detektion des *Y. pestis* F1-Antigens und aktiver Bakterien per ELISA, Durchflusszytometrie und verschiedenen Hand-held Testkits, unter anderem basierend auf ABICAP®-Säulen mit photometrischer Detektion, gezeigt werden.

Weiterhin beschreiben NIKITIN ET AL. (2007a) ein Magnetic Beads-basiertes Detektionssystem zur Detektion von YPF1 aus Puffer. Die Detektionsgrenze des Systems liegt bei 0,1 ng/ml YPF1, der lineare Detektionsbereich erstreckt sich von 0,1 – 1000 ng/ml.

Ein laborunabhängiges System im Dip-Stick Format mit einer Detektionsgrenze von 0,5 ng/ml YPF1 wurde von CHANTEAU ET AL. (2003) entwickelt und in einer Feldstudie in Madagaskar erfolgreich getestet. Auch die Analysezeit von nur 15 Minuten ist beachtlich. Zur Erreichung dieser Leistungsdaten mit dem vorgestellten System der magnetischen Detektion sind weitere Verbesserungen des ABICAP®-Magnetsensor-Systems notwendig.

4.7 Magnetische Detektion von Francisella tularensis

Die Detektion von *Francisella tularensis* mit magnetischer Detektion baute auf die bereits beschriebenen Entwicklungsstufen der CRP- und *Yersinia*-Assays auf. Daher wurde neben einer adsorptiven Immobilisierung des Extraktionsantikörpers auch zu den anderen Assays analoge Puffersysteme verwendet. Dieser Assay richtet sich gegen das *F. tularensis*-Lipopolysaccharid, welches als fertige Präparation zur Verfügung stand.

Die Variation der Antikörper-Konzentrationen für Extraktions- und biotinylierten Detektionsantikörper ergaben eine jeweils optimale Konzentration von 10 µg pro Säule. Die eingesetzte Antigen-Konzentration war mit einer Konzentration analog zu 5 x 10^3 cfu/ml sehr gering, wodurch nur niedrige Messwerte erreicht werden konnten. Daher zeigt

die graphische Darstellung der optimalen Antikörperkonzentration starke Unterschiede der einzelnen Fraktionen, obwohl der tatsächliche Unterschied zwischen den einzelnen Proben nur 20-50 mV betrug. Die starken Unterschiede sind also von der Achsenskala und den allgemein zu gering angesetzten Antigen-Konzentrationen bedingt. Die optimale Antikörperkonzentration von jeweils 10 µg pro Säule ist aber im vergleichbaren Rahmen zu den anderen etablierten Detektionssystemen.

Die Verwendung von Kaninchenserum als Realmatrix basiert auf dem natürlichen Vorkommen des Erregers in Nagetieren. Aufgrund der Serumeigenschaften sollte Kaninchenserum als Detektionsmatrix aber vergleichbar zu anderen Seren, z. B. vom Hasen oder Menschen sein.

Die Detektion des *F. tularensis*-LPS in PBS-Puffer und Kaninchenserum zeigte einen linearen Detektionsbereich von 10^4-10^6 cfu/ml. Die Linearität beider Ausgleichsgeraden ist mit 0,986 bzw. 0,981 noch akzeptabel. Die schlechtere Linearität bei der Verwendung von Kaninchenserum kann wiederum als Matrix-bedingt interpretiert werden. Der hohe Anteil an Salzen und Proteinen im Serum kann die Interaktion der Antikörper stören.

Die Intra-Assays beider Kalibrationen sind zufrieden stellend mit durchschnittlichen Varianzen von 5,5 %. Bei dem Intra-Assay der Detektion in Kaninchenserum sind die Variationskoeffizienten trotz niedrigerer Linearität der Ausgleichsgeraden etwas besser als bei der Detektion in PBS-Puffer. Dies liegt aber wahrscheinlich an allgemeinen Schwankungen der Ergebnisse und sollte kein Effekt der Probenmatrix sein.

Die Detektion von *F. tularensis*-LPS per magnetischer Extraktion aus Kaninchenserum stellt vielleicht die interessanteste Detektionsmethode dar. Hiermit kann wiederum direkt aus einer Probenmatrix extrahiert, angereichert und detektiert werden. Außerdem sind die Signale der Messung wieder deutlich höher als bei der sequentiellen Messung. Auch hier führt die längere Inkubtionszeit zwischen Antikörper-Magnetic-Beds-Komplex und Antigen anscheinend wieder zu einer höheren Bindungsausbeute und somit höheren Signalen bei der Extraktion des Antigen-Antikörper-Magnetic-Bead-Komplexes an dem PE-Sinterkörper der Säule.

Der lineare Messbereich dieser Kalibration reicht ebenfalls von 10^4-10^6 cfu/ml, die Linearität der Ausgleichsgerade ist mit 0,971 aber deutlich schlechter. Auch die Ergebnisse des Intra-Assays sind deutlich schlechter als bei der sequentiellen Messmethode. Dies ist durch die Durchführung des Assays begründbar. Die magnetische Extraktion stellt einen weiteren Bearbeitungsschritt der Probe dar, bei dem Analyt bzw. Analyt-Antikörper-Magnetic-Bead-Komplex verloren gehen können. Auch bei der Resuspendierung der extrahierten Partikel in Messpuffer ist eine inhomogenen Verteilungen oder einer nicht vollständigen Resuspendierung vorstellbar. Zusätzlich kommt es durch die magnetische Extraktion wiederum zu einer Magnetisierung der Probe (vgl. Kap. 4.4), wodurch sich größere Partikel bilden können, welche dann unspezifisch in dem PE-Sinterkörper zurückgehalten werden.

Ein weiterer beachtenswerter Aspekt dieses Assays liegt in der Verwendung von *F. tularensis*-LPS als Antigen. Dieses kann nicht nur spezifisch von den Extraktionsantikörpern aus der Probe gebunden und anschließend markiert werden. Zusätzlich ist eine unspezifische Immobilisierung an den Polymeroberflächen des PE-Sinterkörpers über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem relativ hydrophoben PE und dem Lipidrest des LPS denkbar. Aufgrund der geringen Größe des LPS-Moleküls ist dies auch nach Blockierung der PE-Oberfläche mit Casein möglich. In diesem Fall würde nur eine Markierung des unspezifisch extrahierten LPS mit dem Antikörper-Magnetic-bead-Konjugat erfolgen. Vor einem Einsatz dieses Assays zur Detektion von intakten *F. tularensis*-Bakterien sollte die Messmethode dementsprechend überprüft werden.
Zur Bewertung dieses Assays müssen verschiedene Detektionssysteme für *F. tularensis* betrachtet werden. Die sensitivsten Detektionsmethoden sind auch für dieses Bakterium PCR-basiert.
CHRISTENSEN ET AL. (2006) beschreiben einen Nachweis von 27 Genomequivalenten von *F. tularensis* per Real-time PCR. Vergleichbar ist der Nachweis von 50 cfu/ml mit einem PCR-Microarray in Blut durch TOMIOKA ET AL. (2005). Beide Systeme zeichnen sich durch ihre hohe Sensitivität und Spezifität aus und gewährleisten die wahrscheinlich sicherste Detektion von *F. tularensis* basierend auf der Anwesenheit von DNA. Nachteil PCR-basierter Detektionssysteme sind die bereits beschriebene Notwendigkeit eines Labors mit entsprechender Ausstattung und der relativ zeitaufwendigen Detektionsmethode. Auch für die PCR-basierte Detektion von *F. tularensis* muss DNA erst extrahiert und dann im Cycler amplifiziert werden. Hierdurch dauert eine Bestimmung mehrere Stunden und eine

Unterscheidung zwischen lebendigen und abgestorbenen Bakterien ist aufgrund des DNA-Nachweises nicht möglich.

Die Alternative des mikrobiologischen Nachweises bietet zwar eine Bestimmung von aktiven bzw. lebendigen Bakterienzellen, dauert mit 48-72 Stunden aber sehr lang (SPLETTSTOESSER ET AL., 2005). Gerade bei der hohen Infektionsgefahr und Letalität dieses Bakteriums ist eine schnelle Bestimmung zur Einleitung geeigneter Therapiemaßnahmen notwendig.
Ein Großteil der beschriebenen Tests zur Detektion von *F. tularensis*-Infektionen basiert auf einem Antikörper-Nachweis aus dem Blut bzw. Serum des infizierten Lebewesens. Dies kann per ELISA (BIAGINI ET AL., 2005) oder mittels Microarrays (THIRUMALAPURA ET AL., 2005) erfolgen. In beiden Fällen wurde extrahiertes *F. tularensis*-LPS als Antigen verwendet und immobilisiert. Die Nachweisgrenze beider Systeme lag bei 10 ng Antikörper pro ml Probenflüssigkeit. Alternativ kann zum Nachweis von Antikörpern gegen *F. tularensis* auch ein ELISA mit immobilisierten Zellmembranproteinen von *F. tularensis* verwendet werden (BEVANGER ET AL., 1989).
Außerdem ist eine Detektion des *F. tularensis* per ELISA im Sandwich-Verfahren, wie im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt, auch von anderen Autoren beschrieben worden. GRUNOW ET AL. (2000) beschreiben ein Sandwich-basiertes ELISA-System zur Detektion des *F. tularensis* LPS mit einer Nachweisgrenze von 10^3 cfu/ml. PORSCH-ÖZCÜRÜMEZ ET AL. (2004) vergleichen diesen ELISA mit einem Detektionssystem auf Basis der Durchflusszytometrie und markieren die *F. tularensis*-Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern. Hierbei ergab sich ein leichter Vorteil der Durchflusszytometrie in Bezug auf Detektionsgrenze und Spezifität.
Auch das ABICAP-System konnte mit einem optischen Detektionssystem eine robuste und sensitive Detektion von *Francisella tularensis* in nur 25 Minuten zeigen. Hierbei wurde eine Nachweisgrenze von ebenfalls 10^3 cfu/ml aus Umweltproben (Wasser, Schlamm) und aus Realproben (u.a. humanes und tierisches Blut) für mehrere *Francisella tularensis* – Stämme erreicht (GRUNOW ET AL., 2008). Dies zeigt das Potenzial dieses Plattformsystems in Verbindung mit sensitiver Detektionstechnik.

Eine zum ELISA analoge immunologische Reaktion im Sandwich-Verfahren nutzten O`BRIEN ET AL. (2000) zur Etablierung eines bidiffraktiven Rastersensors mit optischer

Auswertung über eine CCD-Kamera. Dieser Sensor war zur Detektion einer minimalen Konzentration von 10^5 cfu/ml fähig.

Insgesamt sind die vorgestellten Detektionssysteme auf Basis einer ELISA-Sandwich-Reaktion nicht sensitiv genug. Hierzu ist auch der Assay auf magnetischer Detektion zu zählen. Da eine Konzentration von unter 100 cfu/ml bereits ausreichend für eine Infektion mit *F. tularensis* sein kann, reichen die erzielten Detektionsleistungen nicht aus. Mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten System lassen sich nur schwere Infektionen z. B. bei erkrankten und verendeten Lebewesen nachweisen. Eine Detektion von *F. tularensis* in Wasser oder Schlamm ist dagegen nur bei sehr hohen Konzentrationen möglich.

Tatsächlich gibt es neben den PCR-basierten Systemen nur wenige immunologische Assays, die eine zufrieden stellende Sensitivität aufweisen. Ein von der Firma Zeiss (Jena) entwickeltes System (BISAM) nutzt ebenfalls ein Antikörper-basiertes Sandwich-System mit PE-Sinterkörpern in kleinen Chromatographiehülsen. Die Durchführung des Tests erfolgt vollautomatisch, die Detektion erfolgt über eine enzymbasierte Farbreaktion (Meerrettichperoxidase, polyHRP). Die Detektionleistung des Systems wird mit 300 cfu/ml *F. tularensis* angegeben (SCHLEMMER ET AL., 2006).
Ein weiteres immunologisches Sandwich-System basierend auf Magnetic Beads und ihrer Detektion per Induktionsspulen wird von NIKITIN ET AL. (2007) beschrieben. Hiermit konnte *F. tularensis* LPS bis zu einer minimalen Konzentration von 0,1 ng/ml (entspricht ca. 10^2 cfu/ml) und in einem linearen Zusammenhang über vier dekadische Log-Stufen nachgewiesen werden. Dies zeigt deutlich die theoretische Leistungsfähigkeit der magnetischen Detektionstechnik.

4.8 Expression und Charakterisierung des P22 Tail-Spike-Protein

Bei dem Einsatz eines rekombinanten Phagenproteins als biosensorisches Detektionselement handelte es sich um die Suche nach einem Antikörper-Äquivalent. Die Vorteile der Verwendung rekombinanter Proteine gegenüber Antikörpern liegen zum einen in den Herstellungskosten, als auch in der komplizierteren Herstellung der Antikörper mithilfe der Hybridoma-Technik und Zellkultur (STEINGROEWER ET AL., 2007).

Die erfolgreiche Verwendung kompletter Phagenpartikel als Detektionselement in analytischen Anwendungen wurde bereits von PETRENKO UND SOROKULOVA (2004) gezeigt.
Der lytische Phage P22 ist als *S. enteritidis* und *S. typhimurium*-spezifischer Phage ideal als Detektionselement geeignet. Insbesondere die in den tail-spike-Proteinen gelegenen Bindungsdomänen sind hierbei von Interesse. Die Klonierung dieser Proteine zur rekombinanten Herstellung von Wolfgang Klein ermöglichte dementsprechend eine Verwendung der Proteine, auch mit zusätzlichen Modifikationen wie z. B. Biotin, als Detektionselement.
Die Affinität des tail-spike-Proteins zum *S. typhimurium* LPS wurde von ISRAEL (1976) beschrieben. Die exakte strukturelle Aufklärung der Interaktion gelang BAXA ET AL., (1996). Die bereits von ISRAEL (1976) beobachtete Degradation des *S. typhimrium* LPS unter Ablösung der Partikel von der Zelloberfläche wurde von STEINBACHER ET AL. (1997) als Endorhamnosidase-Aktivität des tail-spike Proteins aufgeklärt.

Da bei dem exprimierten tail-spike-Protein keine Endorhamnosidase-Aktivtät aufgefallen ist, kann man vermuten, dass diese Enzymdomäne des Proteins bei der verkürzten Klonierung nicht oder nicht vollständig einbezogen wurde. Dies wäre ein weiterer Vorteil der Verwendung eines rekombinanten Proteins im Gegensatz zu einem nativen Phagenpartikel.

Die Expression des transformierten *E. coli* BL21 (D3) zeigte beste Wachstumsbedingungen mit einem TFB-Medium bei einer Induktionstemperatur von 34°C. Das verwendete TFB-Medium zeichnet sich neben einer sehr hohen Nährstoffdichte durch einem enthaltenen, 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 aus. Dieser hält den Medium-pH während der Fermentation stabil und verhindert ein zu starkes Ansäuren des Kulturmediums mit Abfallprodukten des mikrobiellen Stoffwechsels. Eine zu starke Absenkung des pH-Wertes führt bei basidophilen Bakterien wie *E. coli* oft zu einer Wachstumshemmung. Die abgesenkte Induktionstemperatur von 34°C verlangsamt das bakterielle Wachstum. Durch Absenkung der Wachstumsgeschwindigkeit bzw. bakteriellen Teilungsrate kommt es oftmals zu höheren Ausbeuten an aktivem bzw. korrekt prozessiertem Protein, im Gegensatz zu höheren Gesamtproteinausbeuten bei Inkubationen mit 37°C.

Die Aufreinigung des exprimierten tail-spike Proteins per IMAC-FPLC war aufgrund des angefügten His_6-tags möglich und sehr erfolgreich. Abbildung 108 zeigt die Extraktion des tail-spike-Proteins aus dem bakteriellen Rohextrakt. Nach starker Aufkonzentrierung erkennt man einige schwache Proteinbanden als Kontaminanten, die aber bei einer Anwendung keinen Einfluss haben dürften.

Ein deutlicher Nachteil des tail-spike-Proteins (TSP) zeigte sich bei der Charakterisierung der Bindungseigenschaften. Es bestand keine Möglichkeit, TSP in Form einer Sandwich-Anordnung einzusetzen. Dies macht auch virologisch durchaus Sinn: Hat ein Phagenpartikel eine LPS-Antigen bzw. eine *S. typhimurium*-Zelle entdeckt, so sollte er das Andocken eines zweiten Phagenpartikels an seinen Wirt verhindern. In diesem Zusammenhang ist sowohl die Zerstörung des LPS nach Injektion der Phagen-DNA durch die Endorhamnosidase-Aktivität des TSP als auch die unmögliche doppelte Bindung eines zweiten TSP-Moleküls an dasselbe LPS zu erklären.
Die Nutzung eines heterologen Sandwich-Arrangements zwischen einem TSP-Molekül und einem Antikörper (vgl. Abb. 112) resultierte nur in einem sehr geringen Anstieg des SPR-Signals. Im Rahmen einer biosensorischen Anwendung konnte diese Anordnung nicht genutzt werden. Als Erklärung für den nur schwachen SPR-Anstieg könnte zum einen die polyklonale Eigenschaft des Antikörpers dienen. Dieser kann aufgrund seiner vielfach gestalteten Bindedomänen auch an Bereiche des LPS außerhalb des vom TSP gebundenen Bereiches ankoppeln.
Weiterhin ist auch eine unspezifische Bindung von freiem LPS an die Chipoberfläche nach Zugabe des TSP und der Blockierung mit BSA denkbar. In diesem Fall würde das LPS also nicht vom TSP extrahiert und präsentiert, sondern die Bindung des Antikörpers erfolgt an ein frei vorliegendes LPS-Molekül. In diesem Fall liegt keine Ausbildung einer Sandwich-Anordnung vor.
Die im Vergleich hierzu durchgeführte Sandwich-Messung mit einem homologen Sandwich aus polyklonalen anti-ST Antikörpern zeigte in ihrem SPR-Sensogramm eine klare Messung im Sandwich-Verfahren. Das LPS wird vom zuerst immobilisiertem Antikörper extrahiert und präsentiert; der zweite zugegebene Antikörper bindet an das präsentierte Antigen und ein starke Veränderung des Brechungsindexes an der Bindungsoberfläche aufgrund der lokalen Anlagerung des Antikörpers ist feststellbar.

Die Vermutung der Unvereinbarkeit zwischen TSP und einer Sandwich-Anordnung wurde durch die von Patrick Pfeffer durchgeführte Simulation der Bindungstasche des TSP bestätigt. Das gebundene LPS ist für andere Moleküle nicht erreichbar, eine Sandwich-Anordnung daher unmöglich.
Möglich bleibt aber eine Anwendung des TSP zur Einzelbindung von LPS-Molekülen oder Bakterien, z. B. zur magnetischen Extraktion aus einer Probe als TSP-Magnetic Bead-Konjugat. Eine solche Anwendung von rekombinanten Phagenproteinen wird z. B. von STEINGROEWER ET AL. (2007) beschrieben.
Als Alternative zur rekombinanten Verwendung von Phagenproteinen zur Bindung des *S. typhimurium* LPS beschreiben KULAGINA ET AL. (2005) die Verwendung von LPS-bindenen antimikrobiellen Peptiden. Diese können ebenfalls aus Bakterien, Pflanzen oder Eukaryonten gewonnen werden und sind ebenfalls als Teil der Immunabwehr sehr wirtsspezifisch.

4.9 Diagnostik von S. typhimurium mit magnetischer Extraktion

4.9.1 Detektion im Sandwich-Prinzip

Die Detektion von *Salmonella typhimurium* LPS erfolgte analog zu vorherigen Assays zuerst im Sandwich-Verfahren. Die Möglichkeit dieses Verfahrens zeigte sich bereits in Kap. 3.8 bei der Charakterisierung des P22 tail spike-Proteins. Da mit dem anti-ST Antikörper zudem ein polyklonaler Antikörper verwendet wurde, konnten mehrere Epitope des LPS genutzt werden.

Die Bestimmung der optimalen Antikörper-Konzentration erfolgte analog zu Kap. 3.4 und 4.4 und ergab ideale Antikörper-Konzentrationen von 12,5 µg/Säule für den am PE-Sinterkörper immobilisierten Extraktionsantikörper und 20 µg/Säule für den gleichen, aber biotinylierten Detektionsantikörper zur Kopplung an die Magnetic Beads.
Aufgrund der positiven Vorgaben aus Kap. 3.4 und 3.5 wurde ein 0,15 M PBS-Puffer pH 7,3 verwendet; die adsorptive Immobilisierung des Extraktionsantikörpers erfolgte in 0,1 M Carbonat-Puffer pH 9,5.

Die Bestimmung einer Kalibration zur Detektion von *S. typhimurium* LPS in PBS-Puffer ergab wiederum einen sigmoiden Zusammenhang zwischen LPS-Konzentration und Signalhöhe. Der hieraus abgeleitete lineare Messbereich betrug 500-5000 ng/ml bei einer sehr guten Linearität der Ausgleichsfunktion von 0,994; eine Detektion geringerer Konzentrationen ohne lineare Quantifizierung war aber ebenfalls möglich. Der durchgeführte Intra-Assay war mit einer Gesamt-Varianz von 3,9 % sehr gut.
Die Kalibration in der Realmatrix Chicken Carcass Wash Water (CCWW) zeigte einen etwas verschobenen linearen Messbereich von 50-1000 ng/ml, wobei die Linearität der Ausgleichsfunktion mit 0,982 im Vergleich zur Kalibration in PBS-Puffer deutlich schlechter war. Auch die Gesamt-Varianz des Assays war mit 5,1 % etwas schlechter.
Die Verschiebung des linearen Messbereiches kann in der sigmoiden Funktion der Immunreaktion begründet liegen. Je nachdem wie die sigmoide Funktion verläuft, können teilweise große Unterschiede innerhalb der linearen Bereiche der Funktion auftreten. Ein weiterer Grund kann aber auch die komplexe Probenmatrix sein.

Da bei der beschriebenen sequentiellen Detektionsmethode die flüssige Probe selbst den PE-Sinterkörper passieren muss, kann es bei einigen Probenmatrices oder Probenbestandteilen zu Problemen der Durchflussfähigkeit kommen. Als interessante Alternative zur sequentiellen Detektion wurde bereits mehrmals auf die magnetische Detektion verwiesen. Auch zur Detektion des *S. typhimurium* LPS wurde diese eingesetzt, hierbei wurden die optimalen Parameter der sequentiellen Detektionsmethode verwendet.

Der Vergleich zwischen sequentieller Methode und magnetischer Extraktion zur Detektion von *S. typhimurium* LPS in CCWW ergab einen analogen linearen Messbereich von 50-1000 ng LPS/ml.

Weiterhin wurde die Detektion von *S. typhimurium* LPS in Salad Wash Water (SWW), Milch und verdünntem Eigelb (1:1 v/v mit PBS-Puffer) per magnetischer Extraktion getestet. Hierbei wurden unterschiedliche Quantifizierungsbereiche von 100-2500 ng LPS/ml bei SWW und 500-10000 ng LPS/ml bei Milch sowie 500-5000 ng LPS/ml bei Eigelb ermittelt. Die zugrunde liegenden Konzentrationsabhängigkeiten waren linear (Eigelb und CCWW) oder logarithmisch (SWW und Milch). Ein Zusammenhang zwischen Probenmatrix und Quantifizierungsmöglichkeit ist offensichtlich; eine exakte Zuordnung ist aber nicht möglich. Während CCWW hauptsächlich Proteine und weitere

Serumbestandteile enthält, sind in SWW aufgrund des pflanzlichen Ursprungs auch Saponine (VINCKEN ET AL., 2007) und andere Lipid-ähnliche Strukturen vorhanden. Diese können wie die in der Milch befindlichen Fettsäuren Micellen bilden. Dies könnte ein möglicher Grund für die Ähnlichkeit der logarithmischen Konzentrationsabhängigkeit sein. Eigelb enthält den Emulgator Lecithin, hat aber durch die Verdünnung mit PBS-Puffer eher einen wässrigen Charakter und ist ebenfalls sehr proteinhaltig und daher eventuell vergleichbar zu CCWW als Probenmatrix.

In allen Fällen sollten Beispiele für Probenmatrices vorgestellt werden. Die jeweils erreichten Ausgleichsfunktionen der Quantifizierungsbereiche waren mit 0,97-0,99 für Beispielapplikationen durchaus akzeptabel. Durch die magnetische Extraktion wurden auch komplizierte Probenmatrices zugänglich, die z. B. in ELISAs nicht verwendbar sind.

Die Detektionsgrenzen von ca. 100 ng LPS/ml entsprechen nach eigener groben Schätzung ca. 10^5 Zellen (1 ng = 1000 Zellen). Eine genaue Abschätzung ist nicht möglich, da die Menge an LPS pro Zelle stark von den jeweiligen Kultivierungs- bzw. Umweltbedingungen der wachsenden Kultur abhängt. Die grobe Abschätzung erfolgte nach Vergleich von Detektionen mit LPS und thermisch inaktivierten Zellen.
In diesem Sinne reicht eine alleinige Testung von Lebensmitteln mit magnetischer Extraktion nicht aus.

Insbesondere für die Lebensmittelindustrie ist allerdings die Kombination zwischen magnetischer Extraktion, Detektion und anschließender Validierung per Plattierung der extrahierten Bakterien eine interessante Anwendungsmöglichkeit. Somit können starke Kontaminationen von Lebensmittelproben bereits sofort nach Extraktion erkannt werden, geringe Kontaminationen benötigen der langwierigeren Plattierung und mikrobieller Kultivierung.

4.9.2 Direkte Detektion von *S. typhimurium*

Als alternative Detektionsmethode zum Sandwich-Prinzip wurde eine direkte Detektionsmethode mit nur einem Erkennungsmolekül (anti-ST Antikörper oder TSP) getestet.

Hierbei wurden besondere Oberflächeneigenschaften der PE-Sinterkörper ausgenutzt. Bei einm pH von 9,5 lagern sich so z. B. bei unbehandelten PE-Sinterkörpern Bakterien in die Poren des Filters an.
Analog erfolgt eine Anlagerung bzw. Anreicherung von in der Probenmatrix enthaltenen Bakterien an aminosilanisierte PE-Sinterkörper bei einem leicht sauren pH von 5,0.

Beide Extraktionsmethoden sind unspezifisch. Die Extraktion bei pH 9,5 entspricht der adsorptiven Immobilisierungsmethode von Proteinen. Verwendet man bakterienhaltige Realmatrices, so wirkt ein hoher Proteingehalt störend bzw. verdrängend auf die Bakterien. Eine Verwendung ist also nur in wässrigen Matrices mit geringem Proteingehalt sinnvoll. Nach erfolgter Extraktion der Bakterien bei pH 9,5 wurde die Oberfläche der PE-Sinterkörper mit Caseinlösung blockiert, um unspezifische Anlagerungen von z. B. Magnetic Beads zu unterdrücken.
Die Extraktion bei pH 5 basiert auf einem Patent von HOLLÄNDER ET AL. (2005). Die in der Probe enthaltenen Bakterien lagern sich ebenfalls unspezifisch an die aminosilanisierte Oberfläche an. Aufgrund des für Lebensmittelproben besseren verwendbaren pH-Wertes von 5,0 mit Citrat-Puffer eignet sich diese Methode besser.
Zusätzlich muss darauf hingewiesen werden, dass eine Extraktion der Bakterien aus einer Probe nicht quantitativ erfolgt. Nur ein gewisser prozentualer Querschnitt der in der Probe enthaltenen Bakterien wird extrahiert. Hierbei kann die Affinität einzelner Bakterienarten zur PE-Sinterkörperoberfläche unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

Nach erfolgter Extraktion und Blockierung der verbleibenden freien Bindungsstellen beider Methoden mit Caseinlösung erfolgte die Markierung der extrahierten Bakterienzellen per Magnetic Beads mit magnetischer Detektion bei einem Assay-pH Wert von 7,3 in 0,15 M PBS-Puffer. Die verwendeten Magnetpartikel wurden nicht filtriert.

Bei der Verwendung des biotinylierten anti-ST Antikörpers stellten sich beide Methoden mit einem vergleichbaren quantifizierbaren Detektionsbereich von ca. 2,5 x 10^3- 5 x10^5 (pH 9,5) und 10^4- 2,5 x 10^5 (pH 5,0) Partikeln thermisch inaktivierter *S. typhimurium.*
Die Intra-Assays beider Methoden zeigen ebenfalls ähnliche Gesamt-Varianzen von 4,6 % (pH 9,5) und 5,9 % (5,0).

Als deutlicher Unterschied beider Methoden zeigte sich eine lineare Konzentrationsabhängigkeit bei pH 9,5 und ein logarithmischer Zusammenhang bei pH 5,0. Insbesondere in den Kalibrationsreihen beider Methoden (Abb. 131 und Abb. 134) erkennt man zwar sigmoide Kurvenverläufe, bei pH 9,5 wird aber ab 5 x 10^6 Partikeln eine Extraktions- bzw. Signalsättigung erreicht. Bei pH 5,0 ist der sigmoide Kurvenverlauf deutlich stärker ansteigendend und zeigt daher logarithmische Bereiche. Auch hier ist die Zuordnung eines linearen oder logarithmischen Quantifikationsbereiches abhängig vom sigmoiden immunologischen Zusammenhang der Messung.

Zur Etablierung einer Detektionsmethode für reale Lebensmittelproben muss vor allem die Verwendbarkeit der Probe mit diesem System beachtet werden. Denkbar sind Lebensmittel mit gering bis mäßigem Proteingehalt, die teilweise sehr hohe bakterielle Belastungen aufweisen können, wie z. B. Bier.

Die Verwendung von TSP als alternatives Detektionsmolekül funktionierte bei der pH 9,5-Methode sehr gut. Ein vergleichbarer linearer Messbereich von 2,5 x 10^3 – 1 x 10^5 Partikeln *S. typhimurium* mit einer guten Linearität der Ausgleichsfunktion von 0,992 konnte ermittelt werden. Auch der Intra-Assay war mit einer Gesamt-Varianz von 4,9 % vergleichbar gut. Allerdings fiel bei der Verwendung von TSP eine deutlich höhere Varianz der Blindwert (ohne Bakterien)-Proben von 10,2 % auf.

Bei der pH 5,0-Methode mit aminosilanisierten PE-Sinterkörpern zeigte sich ein ebenfalls vergleichbarer Detektionsbereich von 2,5 x 10^3 – 1 x 10^5 Partikeln *S. typhimurium*, ebenfalls als logarithmischer Zusammenhang. Hier wurde ein Nachteil der TSP-Verwendung in Form deutlich erhöhter Varianzen des Intra-Assays mit einer Gesamt-Varianz von 10,9 % deutlich.
Weiterhin erkennt man beim Vergleich der Kalibrationsreihen zwischen dem anti-ST Antikörper und dem TSP-Molekül bei beiden Extraktionsmethoden signifikant geringere Signale bei Verwendung von TSP. Dies kann in der Bindungsstruktur des TSP-Moleküls begründet liegen. Es verfügt über nur eine Bindungsstelle für das LPS, der polyklonale Antikörper über zwei eventuell verschiedene Bindungsdomänen.

4.9.3 Direkte Detektion mit einem kompetitiven Assay

Als weitere Alternative der Detektion von *S. typhimurium* LPS wurde eine komeptitive Anordnung getestet. Hierbei wird die Anlagerung des Antikörper-Magnetic Bead-Konjugats nach erfolgter Interaktion mit dem in der Probe enthaltenen LPS an eine definierte LPS-Oberfläche bestimmt. Je höher der in der Probe enthaltene LPS-Anteil ist, desto weniger Bindungsstellen des Antikörper-Magnetic Bead-Konjugats stehen dann noch zur Bindung an die PE-Sinterkörper-Oberfläche zur Verfügung (vgl. Kap. 3.9.3).

Es wurde sowohl die sequentielle Detektionsmethode, als auch die Kombinantion mit magnetischer Extraktion getestet. Die verwendeten Magnetic Beads wurden nicht filtriert. Die Detektion in Puffer ergab einen linearen Detektionsbereich von 10-750 ng LPS/ml bei einer sehr guten Gesamt-Varianz von 3,3 %.

Die Anwendung der kompetitiven Detektion in CCWW ergab einen etwas schlechteren Detektionsbereich von 100-1000 ng LPS/ml; die Gesamt-Varianz war aber mit 3,5 % vergleichbar gut. Der geringe Unterschied der Detektionsbereiche kann von der komplexen Realmatrix CCWW bedingt worden sein, wobei auch die Linearitäten der beiden Ausgleichsgeraden vergleichbar gut waren (0,996 bzw. 0,993).

Als besonders sensitive kompetitive Detektionsmethode stellte sich die magnetische Extraktion des *S. typhimurium* LPS aus CCWW dar. Ein linearer Messbereich von 5-100 ng LPS konnte ermittelt werden. Allerdings war die Linearität der Ausgleichsgerade mit 0,984 deutlich schlechter als bei der sequentiellen Methode, wobei die Gesamt-Varianz des Intra-Assays mit 3,1 % wiederum sehr gut ausfiel.

Legt man erneut die grobe Abschätzung des LPS-Bakterienzahl Verhältnisses von 0,1 ng LPS pro 100 Zellen zugrunde, so könnte die Detektionsgrenze dieses Assays bei 5 x 10^3 Zellen liegen. Dies ist vergleichbar mit der direkten Detektion an modifizierten PE-Sinterkörpern aus Kap. 4.9.2.
Im Gegensatz zur Detektion im Sandwich-Prinzip ist die Verwendung nur eines einzelnen Detektionsmoleküls sensitiver. Anscheinend kommt es im Zuge der Extraktion und anschließenden Markierung des extrahierten und präsentierten Analyten zu Signalverlusten

durch nicht vollständig quantitative Extraktion des Analyten aus der über die Säule gegebenen Probe.

4.9.4 Vergleich der Detektion von *S. typhimurium*

Laut gesetzlicher Vorgabe müssen Lebensmittel frei von einer Kontamination mit *S. typhimurium* sein. Eine solche Bestimmtheit lässt sich, wenn überhaupt, nur durch Ausplattierung einer mit Anreicherungsmedium vorinkubierten Probe erreichen (JUNE ET AL., 1996). Nachteile dieser in Lebensmittelbetrieben immer noch hauptsächlich angewandten Methode liegen in der langen Auswertedauer von bis zu 72 h, je nach Grad der Vorinkubation und dem hohen Arbeitsaufwand.
Wie bereits bei anderen Applikationen vorgestellt ist die sensitivste Detektionsmethode für *S. typhimurium* die PCR. Diese leisten z. B. mit einer Vorinkubation von ca. 6 h Detektionslimits von 10 cfu/g Lebensmittel (AGARWAL ET AL., 2002).
Die Nachteile der PCR-basierten Detektion wurden allerdings bereits mehrmals aufgeführt, insbesondere der hohe technische Aufwand und die hohe Anzahl an Arbeitsschritten bis zum endgültigen Ergebnis machen die Verwendung PCR-basierter Methoden z. B. in Lebensmittelbetrieben unwirtschaftlich.

Zur Detektion von *S. typhimurium* existiert eine Vielzahl validierter und erfolgreich verwendeter ELISA-Tests. Je nach Verwendung verschiedener Antikörper, Verstärkungsenzyme und Detektionstechnik lassen sich Detektionsgrenzen von 10^4-10^5 cfu *S. typhimurium* pro ml erreichen (MACIOROWSKI ET AL., 2006). Mit entsprechender Vorinkubation lassen sich Detektionslimits von bis zu 1 cfu erreichen (nach 36 h, BOLTON ET AL., 2000).

Weitere Detektionssysteme konnten bisher nicht etabliert werden. So beschreiben z. B. OH ET AL. (2004) einen SPR-basierten Assay zur Detektion von *S. Typhimurium* ohne Vorinkubation mit einem Detektionsbereich von $10^2 – 10^9$ cfu/ml. KO UND GRANT (2006) beschreiben einen Fluoreszenz-basierten FRET-Sensor mit einem Detektionslimit von 10^3 cfu/ml in Puffer und 10^5 cfu/ml in homogenisiertem Schweinefleisch.
Ein Nachweis von *S. Typhimrium* mit Fluoreszenz-Partikeln und einer cytometrischen Extraktion der markierten Zellen auf einem Mikrochip wurde von IKEDA ET AL. (2006) zur Anreicherung einer ebenfalls Chip-basierten PCR-Evaluierung der Probe verwendet. DILL

ET AL. (1999) erreichten die Detektion von 10^2 cfu/ml aus CCWW mit einer Immunofiltration.

Insgesamt betrachtet ist der Einsatz von Magnetic Beads zur Extraktion von *S. typhimurium* bereits weit etabliert. So beschreiben z. B. CUDJOE UND KRONA (1997) eine Extraktion von *S. typhimurium* und anschließende Plattierung mit einer Detektionsgrenze von 1-5 cfu/ 25 g Lebensmittelprobe. TAN UND SHELEF (1999) erweiterten die magnetische Extraktion um eine automatisierte Kultivierung mit einer optischen Auswerteeinheit und erreichten Detektionsgrenzen von 2 – 25 cfu pro 25 g Lebensmittel mit einer totalen Bearbeitungszeit von 24 h.
Auf die Anwendung der magnetischen Extraktion von *S. typhimurium* hat z. B. der Partikelhersteller Dynal mit der Entwicklung einer speziellen Magnetpartikelreihe (Dynabeads anti-Salmonella®) reagiert.

Weiterhin wurde eine magnetische Extraktion von *S. typhimurium* auch zur Anreicherung der Probe vor einer PCR-Evaluierung verwendet. STRAUB ET AL. (2005) erreichten so Detektionsgrenzen von 10^2 cfu/ml aus verschiedensten Probenmatrices in einer automatisierten Anwendung. SPANOVA ET AL. (2003) beschreiben die zielgerichtete Entwicklung von Magnetpartikeln mit Immobilisierungsmethoden für anti-Salmonella Antikörper, die den Einsatz der Magnetic Beads auch direkt in der PCR-Reaktion ermöglichen.

Eine Kombination der magnetischen Extraktion mit anderen Nachweismethoden ist ebenfalls möglich. YANG UND LI (2006) beschreiben die Verwendung einer Mikroelectrode zur Detektion von *S. typhimurium* nach Extraktion der Bakterien aus einer Probe mithilfe von Magnetic Beads. Der beschriebene Detektionsbereich lag bei $10 – 10^6$ cfu/ml.
GUNTUPALLI ET AL. (2007) stellen die Verwendung von Magnetic Beads zur Extraktion, aber auch als detektierbares Markierungselement vor. Sie extrahieren die *S. Typhimrium*-Zellen aus einer Probe mit Magnetic Beads und weisen diese dann mit einer Quartz-Mikrowaage (QCM) nach. Hierbei wurde ein Detektionslimit von 5×10^3 cfu/ml erreicht.

Ein Detektionssystem mit Magnetic Beads und Induktionsspulen-basierter magnetischer Detektion für *S. Typhimrium* beschreibt NIKITIN ET AL. (2007b). Hier wird eine Detektionsgrenze von 10^3 cfu/ml erreicht.

Im allgemeinen Vergleich liegt die vorgestellte magnetische Detektion von *S. typhimurium* im Bereich der ELISA-basierten Detektionssysteme. Andere, ebenfalls Magnetic Beads-basierte Systeme erreichen niedrigere Detektionsgrenzen. Besonders interessant erscheint aber die direkte Detektion von *S. typhimrium* mit modifizierten PE-Sinterkörpern und die Verwendung von rekombinanten Phagenproteinen als alternatives Detektionselement.

4.10 Detektion von Clostridium botulinum

Die Entwicklung eines immunologischen Systems zur Detektion von *Clostridium botulinum* Toxoid B (Botox B) war relativ kompliziert. Aufgrund gesetzlicher Bestimmungen musste auf eine Protein-Präparation von *C. botulinum* der Senova GmbH als Antigen zurückgegriffen werden. Für diese Präparation gab es keine Konzentrationsbestimmung des enthaltenen Botox B.

Zur immunologischen Detektion des Botox B wurde auf verschiedene Antikörper zurückgegriffen. Das verwendete Fab-Fragment ist ein polyklonales Antikörperelement, welches aus dem Serum immunisierter Pferde gewonnen wird und im therapeutischen Einsatz bei Botox B-Intoxikationen eingesetzt wird.
Die beiden monoklonalen Antikörper der Firma Hytest Ltd. sind speziell zur Nutzung in Sandwich-Arrangements entwickelt und optimiert worden.

In einem ersten Schritt wurde die Funktionalität der einzelnen Antikörper gegen das Botox B-Antigen mittels SPR getestet. Hierzu wurde das Botox B auf einer C18-Matrix immobilisiert. Da es sich bei dem Botox B um ein Protein handelt, sollte dieses auf der bereits beschriebenen hydrophoben C18-Matrix auch in Selbstorganisation immobilisieren. Freie Bindungsstellen wurden mit BSA geblockt und anschließend die jeweiligen Antikörper zugegeben. Hierbei wurde die Konzentration des Fab-Fragments mit 500 µg/ml bewusst höher als die Konzentration der Antikörper mit 200 mg/ml gewählt, da es sich hierbei um eine lyophilisierte Serumpräparation handelte. Diese kann neben dem gewünschten Fab-Fragment auch mehrere andere Serumproteine enthalten; hierdurch wird die Konzentration des tatsächlich eingesetzen Fab-Fragments verringert.

Das Ergebnis war nicht positiv. Das verwendete Fab-Fragment zeigte überhaupt keine Anlagerung, die eingesetzen Antiköper nur ein sehr geringes Signal nach dem abschließenden Spülvorgang.
Trotzdem wurde eine Detektion des Botox B per Sandwich-Anordnung getestet. Hierbei wurde der ACBB 27 –Antikörper immobilisiert und der ACBB 18-Antikörper zur Markierung eingesetzt. Dies entsprach der Empfehlung des Herstellers.

Ein erster Test im Sandwich-Verfahren zeigte einen leichten Signalanstieg von ca. 4,75 AU nach Zugabe des Markierungsantikörpers. Es bestand die Annahme, das Botox B aus der Probe extrahiert, präsentiert und markiert worden ist. Zur Signalsteigerung des relativ geringen Signals wurde der Markierungsantikörper ACBB 18 biotinyliert. An dieses Biotin-Motiv konnte nun in einem Signalverstärkungsschritt Streptavidin gekoppelt werden.
Der Test dieser Messanordnung (Abb. 155) zeigte ebenfalls eine geringe Signalsteigerung bei Anlagerung des Markierungsantikörpers. Zusätzlich ergab die Verwendung von Streptavidin in einem zweiten Schritt einen deutlichen Signalanstieg von ca. 60 AU, hierdurch wäre eine signifikante Detektion möglich gewesen.
Allerdings zeigte die ebenfalls durchgeführte Kontrolle des Systems ohne Zugabe von Botox B, dass der eingesetzte Markierungsantikörper nicht spezifisch an extrahiertes und präsentiertes Botox B ankoppelte, sondern sich unspezifisch an die Chipoberfläche anlagerte. Das anschließend zugefügte Streptavidin konnte dementsprechend wieder an den unspezifisch vorhandenen Markierungsantikörper binden und zeigte ein ebenfalls starkes, aber unspezifisches Signal.

Eine Detektion von Botox B in einem Sandwich-Verfahren mithilfe der SPR ist also nicht möglich. Ein Grund für die unspezifische Anlagerung des Markierungsantikörpers an die Chipoberfläche kann in nicht ausreichendem Blockieren der Oberfläche mit BSA gelegen haben. Allerdings wurde eine normalerweise ausreichende Konzentration von 250 g/ml verwendet, welche z. B. bei der CRP- und *S. typhimurium* LPS-Detektion gut funktioniert hat. Betrachtet man die Anlagerung der Antikörper im Rahmen des SPR-Signals in Abb. 155, so fällt eine starke Anlagerung des Extraktionsantikörpers ACBB 27 von ca. 50 AU auf; der Detektionsantikörper ACBB 18 lagert sich im Vergleich dazu nur sehr wenig an. Dies vor allem nachdem BSA zugegeben wurde und sich praktisch keine Anlagerung

an die Oberfläche zeigte. Dies spricht eher gegen verbliebende freie Bindungsstellen. Es könnte daher auch sein, das die beiden eingesetzen Antikörper eine Kreuzspezifität gegeneinander aufweisen.

Aufgrund der relativ unsensitiven Detektionsleistung der SPR (vgl. CRP-Assays) wurde eine Detektion des *C. botulinum* Botox B mit magnetischer Detektion in Betracht gezogen. Hierzu konnte das gleiche Sandwich-Arrangement wie bei der SPR-basierten Detektion verwendet werden. Der Antikörper ACBB 27 wurde an den PE-Sinterkörpern per adsorptiver Selbstorganisation immobilisiert und der biotinylierte ACBB 18-Antikörper an die Magnetic Beads gekoppelt.
Zur Optimierung des Systems wurden die optimalen Konzentrationen der eingesetzten Antikörper ermittelt. Die Variation des Extraktionsantikörpers ACBB 27 ergab dabei einen steigenden Trend. Je mehr Extraktionsantikörper eingesetzt wurde, desto höher war das erhaltene Signal. Hielt man die Konzentration des Extraktionsantikörpers konstant und variierte die Konzentration des Detektionsantikörpers ACBB 18, so ergab sich ein negativer Trend, d. h. das Signal sank mit steigender Antikörper-Konzentration. Ein solches Ergebnis ist für eine Optimierung sehr untypisch, man erwartet eher ein Konzentrations-Optimum. Tatsächlich stützt dieses Ergebnis aber die Hypothese der Kreuzspezifität zwischen den eingesetzten Antikörpern. Der Extraktionsantikörper bindet anscheinend den Detektionsantikörper; je mehr Extraktionsantikörper immobilisiert wurde, desto höher das Signal. Der negative Trend bei der Variation des Detektionsantikörpers lässt sich in diesem Fall durch sterische Interaktionsprobleme erklären. Die Konzentration des Extraktionsantikörpers ist konstant; dieser kann eine maximale Zahl von Detektionsantikörpern nur bei optimaler Zugänglichkeit des Detektionsantikörpers binden. Sind zu viele Detektionsantikörpermoleküle vorhanden, behindern sich diese sterisch bei der Bindung durch den Extraktionsantikörper und das erreichte Signal sinkt mit ansteigender Detektionsantikörperkonzentration. Zur Veranschaulichung zeigt Abb. 181 eine schematische Darstellung der Bindung.

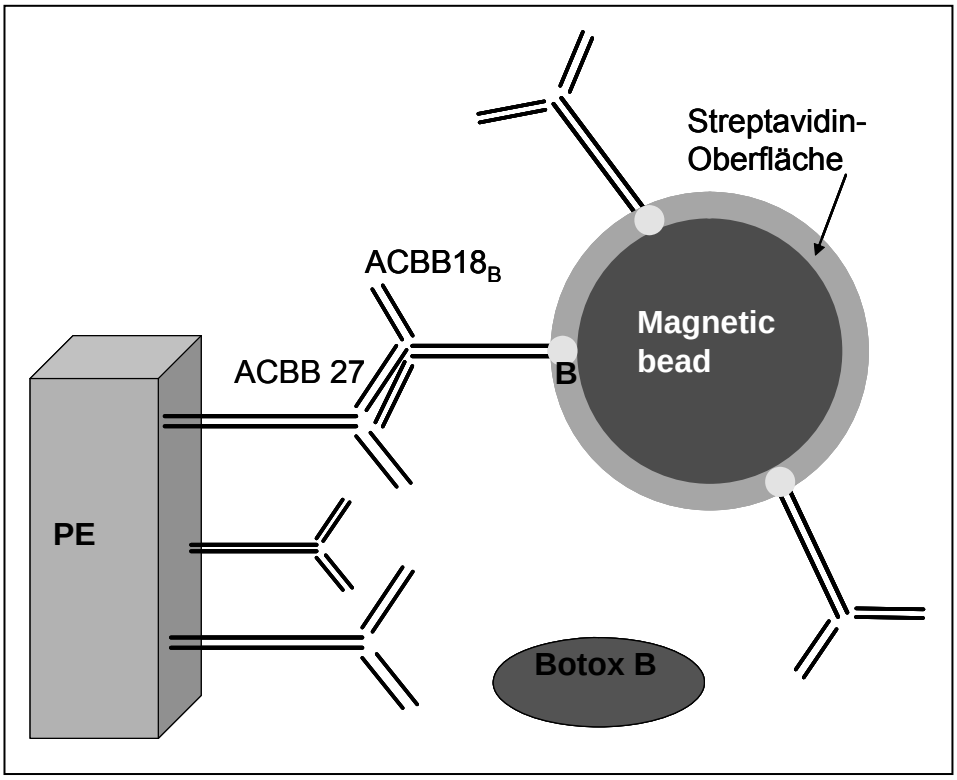


Abbildung 181 **Schematische Darstellung der Kreuzspezifität zwischen den verwendeten Antikörpern.** B = Biotinylierung. Botox B ist bei dieser Bindung zwar vorhanden, aber nicht beteiligt.

Die Erzielung eines Signales bei dieser Optimierung ist also nicht bedingt durch die Anwesenheit von Botox B und somit nicht spezifisch.

Die Analyse einer Konzentrationsabhängigkeit des gemessenen Signals bei konstanter Antikörperkonzentration brachte dementsprechend kein Ergebnis. Die einzelnen Messwerte schwanken im Rahmen der Standardabweichung um den Blindwert (Messung ohne Botox B), bzw. nach Abzug des Blindwertes von den einzelnen Messwerten um den Wert null mV.

Eine Detektion von *C. botulinum* Botox B war dementsprechend nicht möglich, weder per SPR noch mit Magnetic Beads. Fraglich ist, ob die geringe Kreuzspezifität der eingesetzten Antikörper hierauf einen Einfluss hatten. Wahrscheinlich hätte die Kreuzspezifität nur zu einer Erhöhung des Blindwertes und der einzelnen Messwerte in einem geringem Umfang geführt, diese Erhöhung wäre dann durch Abzug des Blindwertes ohne Botox B von den einzelnen konzentrationsabhängigen Messwerten eliminiert worden. Die Kreuzspezifität war also kein Hindernis bei der Etablierung des Botox B-Assays.

Tatsächlich wurde letztendlich überhaupt keine Interaktion des Botox B mit den eingesetzten Antikörpern festgestellt, obwohl diese laut Hersteller hierzu geeignet waren. In einer letzen Kontrolle wurde dann die Botox B-Präparation der Firma Senova GmbH auf Anwesenheit von Botox B mittels eines SDS-PAGE untersucht.

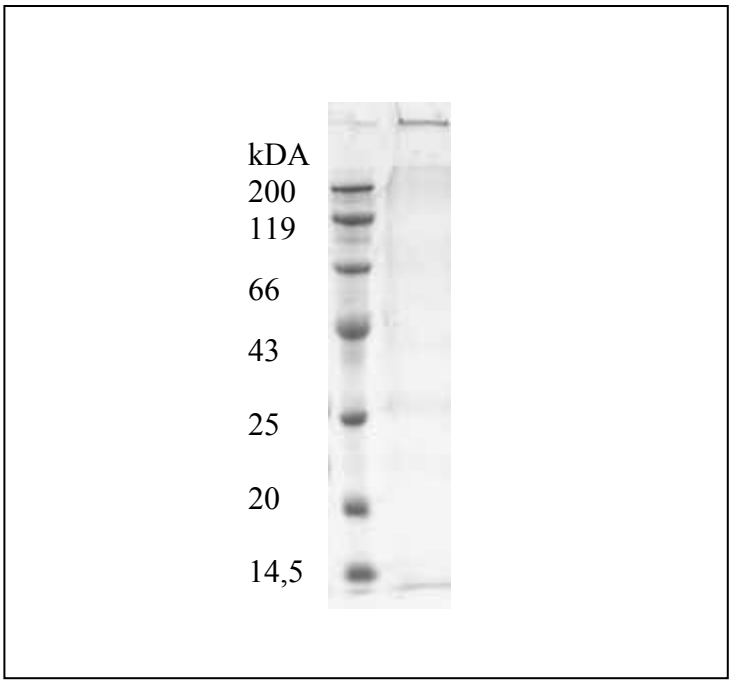


Abbildung 182 SDS-PAGE der Botox B-Präparation. Linke Spur = Marker, rechte Spur = Probe.

Hierfür wurden 5 µl der Orginalsubstanz mit 5 µl Ladepuffer gemäß den Vorgaben des Herstellers aufgetragen.

Man erkennt keine einzige vorhandene Proteinbande, die am Beladungsbereich des Gels liegende Bande resultiert von wahrscheinlich von makromolekularen Probenbestandteilen. Die unterste Bande ist die angefärbte Lauffront des Gels. Das heißt, die Botox B-Präparation enthielt kein Botox B. Jede Interaktion zwischen Antikörpern und Botox B kann somit faktisch nicht stattgefunden haben, was auch die jeweils schlechten bzw. nicht vorhandenen Signale erklärt. Die Botox-Präparation wurde mit gleichen Ergebnissen noch ein zweites Mal bezogen.

Die Etablierung eines Botox B-Assays mittels SPR oder magnetischer Detektion war dementsprechend aufgrund eines fehlenden Antigens nicht möglich.

Der Nachweis des *C. botulinum* Toxins kann nur über immunologische Tests oder per Injektion in ein Labortier erfolgen.

Die Detektion von *C. botulinum* mithilfe der PCR ist zwar möglich und auch sehr sensitiv, so weisen z. B. FACH ET AL. (1996) *C. botulinum* mit Detektionsgrenzenbis von bis zu 10 cfu *C. botulinum* pro ml Probe in Puffer und HIELM ET AL. (1996) von bis zu 100 cfu pro kg Fisch nach. Der Nachteil der PCR ist aber der reine Organismennachweis basierend auf dem Vorhandensein der DNA.
Ein Toxin-Nachweis z. B. in kontaminierten Lebensmitteln oder als pulvrige Präparation zur Anwendung als B-Waffe ist mittels PCR dagegen nicht möglich.

Der Nachweis von *C. botulinum* Toxin per ELISA wird z. B. von GUGLIELMO-VIRET ET AL. (2005) beschrieben und mit einem elektrocheminuleszenten Immunoassay (ECL) verglichen. Beide Systeme zeigen Detektionsgrenzen von 1,5 ng/ml Toxin (ELISA) bzw. 0,4-0,8 ng/ml Toxin (ECL). Bei einem LD_{50} von 1-5 ng/kg für Botox A bei oraler Aufnahme (Maus, MONTECUCCO UND MOLGA, 2005) sind solche Tests mit ihrer Sensititvität ausreichend angelegt.
Eine weitere Alternative Detektionsmethode immunologische Reaktion im Sandwich-Verfahren beschreiben O`BRIEN ET AL. (2000) mittels Etablierung eines bidiffraktiven Rastersensor mit optischer Auswertung über eine CCD-Kamera. Dieser Sensor war zur Detektion einer minimalen Konzentration von 100 ng Botox A/ml fähig.

4.11 Aufbau einer Fluidik mit magnetischer Detektion

Der Aufbau einer fluidischen Anwendung mit magnetischer Detektion stellt einen Schritt in Richtung Proben- und Messautomatisierung dar. Zu diesem Zweck wurde das bereits beschriebene CRP-Detektionssystem im Sandwich-Prinzip mit den Antikörpern antiCRP C2 und antiCRP $C6_B$ wie in Kap. 3.4 verwendet.
Der Aufbau eines fluidischen Detektionssystems war möglich, da der Magnet Reader-Prototyp am unteren Ende des Messkopfes über einen Auslass verfügt. Zur Messung wurde also eine fertig beschichtete ABICAP®-Säule in den Messkopf eingesetzt und mit Schläuchen am oberen und unteren Ende verbunden. Durch den oberen Schlauch erfolgte die Zuleitung der Probe; der untere Schlauch diente nur zur Ableitung der Flüssigkeiten in einen Sammelbehälter.

In diesem Sinne war die verwendete Messsäule also ein Einmal-Artikel, eine Regeneration und Wiederbeschichtung der PE-Oberfläche des Sinterkörpers war nicht möglich.

Da bisher keine Erkenntnisse über das Verhalten der chemagen Magnetic Beads in fluidischen Anwendungen vorlagen, wurden zuerst verschiedene PE-Sinterkörper getestet. Der PE-Sinterkörper 180.C wurde in allen bisherigen Anwendungen dieser Arbeit verwendet. Der Porendurchmesser von 50 µm hätte aber bei einer fluidischen Anwendung problematisch für die Durchleitung der Partikel (ca. 1 µm) mit Druck werden können. Daher wurde auch der PE-Sinterkörper 120.C mit einem Porendurchmesser von 100 µm getestet. Tatsächlich waren beide PE-Sinterkörper im Messergebnis fast identisch. Beide zeichneten sich durch einen hohen Blindwert (Messung ohne Antigen) aus.
Anscheinend kommt es durch den Probenfluss unter Druck zu einer Deponierung von Magnetic Beads in einzelnen Taschen der PE-Sinterkörper, die bei Messungen der normalen Methode ohne Fluidik nicht so extrem auftraten. Zusätzlich wurden die Magnetpartikel im Rahmen der fluidischen Messungen unfiltriert eingesetzt; hierdurch enthalten die Magnetic Bead-Lösungen auch größere Agglomerate von Magnetic Beads, die sich leichter in Poren festsetzen können. Die Verwendung unfiltrierter Beads erfolgte aber auch bei Messungen mit magnetischer Extraktion; auch hier waren die Blindwerte höher als bei Messreihen mit filtrierten Beads.

Im Vergleich der PE-Sinterkörper ist das Signal-Blindwert-Verhältnis bei dem PE-Sinterkörper 120.C etwas besser; dafür zeigt der PE-Sinterkörper 180.C etwas höhere absolute Signale. Die Unterschiede sind aber gering und liegen teilweise im Bereich der Standardabweichungen. Da bereits ein guter Erfahrungswert zum PE-Sinterkörper 180.C aus vorherigen Assays bestand, wurde mit diesem weitergearbeitet.

Die Optimierung des Pufferflusses für die fluidische Detektion zeigte ein typisches Problem bei einem Einsatz von Partikeln in bewegten Flüssigkeiten. Bei einem zu niedrigen Pufferfluss kam es zu Sedimentation der Partikel und Deponierungen der Magnetic Beads an Kupplungsstellen und waagerechten Schlauchstücken. Hierdurch fehlte die verlorene Menge an Beads natürlich in der Messsäule und die erhaltenen Signale wichen bei niedrigem Pufferfluss stark voneinander ab. Dieses Problem konnte ab einem Pufferfluss von 0,8 ml/min in Kombination mit der gezielten Verwendung von Luftblasen innerhalb der Schläuche gelöst werden. Nach Einsaugen der Magnetic Beads bzw.

Probenlösung mit Partikeln ließ man eine kleine Luftblase mit ansaugen, bevor der Probenaufnahmeschlauch in das Puffervorratsgefäß gesteckt wurde. Hierdurch kam es zu einer Propfenströmung der Luftblase, an deren Wasser-Luft-Grenzschicht die eventuell sedimentierten Magnetic Beads getrieben wurden. Mit dieser einfachen Lösung gelang es, die Magnetic Beads quantitativ in die Messsäule zu bringen. Die verwendete Luftblase verhoffte innerhalb der Messsäule an einer Kupplungsstelle, die noch oberhalb der Anregungs- und Detektionsspulen lag. Hierdurch hatte die Luftblase keinen Einfluss auf die Messung.
Die Testung von höheren Flussraten führte zu einer Erhöhung des Drucks im System und zusätzlich zu einer Verringerung der Kontaktzeit zwischen Extraktionsantikörper der festen Phase (PE-Sinterkörper) und den Bestandteilen der flüssigen Phase. Durch die kürzere Kontaktzeit kam es auch zu geringen Extraktionsausbeuten des Analyten und somit zu niedrigeren Signalen. Auch höhere Scherkräfte und somit eine negative Beeinflussung der immobilisierten Antikörper kann vermutet werden.
Als optimale Flussrate wurde daher ein Wert von 0,9 ml pro min identifiziert.

Die Methode der Probenvorinkubation hatte schon bei der magnetischen Extraktion zu höheren Signalen geführt. Entscheidend ist hier ebenfalls die deutlich längere Kontaktzeit zwischen dem Analyten und dem Antikörper-Magnetic-Beads-Konjugat. Hierdurch kommt es zu einer höheren Bindungsausbeute und somit zu höheren Signalen.
Als positiver Nebeneffekt verringerte die Vorinkubation der Probe die notwendige Probenbearbeitung und die Messdauer, da die Magnetic Beads und der antiCRP C6B-Antikörper direkt in die Probe mit dem Analyten gegeben werden konnten. Nach Durchmischung und Inkubation für 1h wurde die gesamte Probe einfach durch die Säule gepumpt und der Signalzuwachs ausgelesen.

Die Optimierung der eingesetzten Antikörperkonzentrationen ergab eine optimale Konzentration von 10 µg/Säule; höhere Konzentrationen ergaben nur leichte Signalsteigerungen im Rahmen der Wertestreuung. Analog zur optimalen Detektionsantikörperkonzentration antiCRP $C6_B$ von 2,5 µg pro Säule entsprechen diese optimalen Antikörperkonzentrationen den Ergebnissen des CRP-Assays ohne Fluidik.

In der Darstellung einiger konzentrationsabhängiger Signalkurven der Abbildung 166 erkennt man den typischen Signalanstieg nach 2,5 min. Die Probe wurde nach 1 Minute

Vorlaufzeit in das System eingesaugt, die Dauer der Probenpassage bis zum Messkopf dauert also 1,5 min. Man erkennt eine sehr ruhige Basislinie ohne externe Einflüsse. Auch der Signalanstieg bei Eintreffen der Magnetic Beads am Messkopf ist bei allen Konzentrationen ähnlich steil, was für eine gute laminare Propfenströmung der Probe im fluidischen System und eine gute Verteilung der Probe innerhalb des Messsäule spricht.
Auffällig ist der relativ hohe Anstieg des Blindwertes (ohne Antigen) von ca. 550 mV; es kommt also auch zu einer signifikanten unspezifischen Anlagerung bzw. Deponierung der Magnetic Beads am PE-Sinterkörper.
Die Signalkurven zeigen ein typisches Signal-Sättigungsverhalten, sobald keine Magnetic Beads sich mehr in der flüssigen Phase des Systems im Messkopf befinden. Das während des nachfolgenden Spülens mit Puffer aufgezeichnete Signal erscheint weitestgehend konstant. Im Detail beobachtet man einen leichten Signalabfall, der für ein Auswaschen der gebundenen Partikel stehen könnte.
Betrachtet man dieses Signal im Bezug auf das beschriebene Phänomen des Signalanstiegs bei andauernder Messung, so muss dieses Phänomen eigentlich auch hier erwartet werden. Hier sind zwei Möglichkeiten denkbar: Zum einen kann es zu einem theoretisch starken Anstieg des Signals durch die bereits beschriebene Magnetisierung und Agglomeration der Magnetic Beads kommen; diesem wirkt eine starke Auswaschung der Partikel entgegen und die Effekte heben sich weitestgehend gegenseitig auf. Zum anderen kommt es trotz andauernder Messung nicht zu einer Agglomeration der Partikel als Ergebnis der stattfindenden Magnetisierung, da der konstante Pufferfluss eine konstante Kraft auf die Partikel ausübt und diese sich nicht einfach innerhalb des PE-Sinterkörpers aufeinander zu bewegen können. Eventuell kommt es auch zu einer Mischung beider Effekte.
Letztendlich entscheidend ist die gute Signalstabilität während des Spülvorganges, was eine hinreichende Quantifizierung der Probe ermöglicht.

In Abb. 166 erkennt man bereits einen geringeren Signalzuwachs bei CRP-Konzentrationen über 400 ng/ml. Dieses Ergebnis zeigte sich auch im Rahmen der Kalibrierung in Abb. 168. Der Zusammenhang zwischen Signal und CRP-Konzentration ist wiederum ein sigmoider Kurvenverlauf, wobei dennoch ein linearer Messbereich von 25-400 ng CRP pro ml abgeleitet werden kann.
Dieser Konzentrationsbereich ermöglicht auch für dieses fluidische System eine Detektion des humanen CRP in dem sehr interessanten Bereich unter 1 µg/ml.

Problematisch ist hierbei nur die relativ hohe Standardabweichung des Blindwertes (15,8 % im Intra-Assay), wodurch auch Messungen bei CRP-Konzentrationen unterhalb von 25 ng/ml zwar machbar, aber nicht sinnvoll waren. Anscheinend kommt es durch die Verwendung unfiltrierter Magnetic Beads in Kombination mit der fluidischen Detektion zu variierend hohen unspezifischen Anlagerungen der Magnetic Beads an den PE-Sinterkörper und somit zu dieser starken Schwankung des Blindwertes.
Die Standardabweichungen der einzelnen Messwerte innerhalb des Intra-Assays waren gut und für einen Immunoassay durchaus akzeptabel.

Aufgrund der schlechten Ergebnisse bei der Detektion von CRP in humanem Serum (vgl. Kap. 3.11) bedingt durch den hohen Ursprungs-CRP-Gehalt der Probe wurde als Realmatrix auf Kaninchenserum zurückgegriffen. Das Kaninchen-CRP sollte von den verwendeten Antikörpern nicht erkannt und somit nur zugegebenes humanes CRP detektiert werden können.
Der Einsatz von Kaninchenserum als Probenmatrix in der Fluidik erwies sich als unmöglich. Der sehr hohe Proteingehalt des Serums führte bei der Passage durch einzelne Schlauchabschnitte zu einer Blasen- bzw. Schaumbildung. An diesen Luft-Serum-Grenzflächen kam es zu einer Ansammlung von Proteinen, wodurch die homogene Verteilung des Analyten innerhalb der fluidischen Probe gestört wurde. Zusätzlich passierte der Schaum den PE-Sinterkörper und störte dabei die magnetische Detektion.
Eine Verwendung von Serum als Probenmatrix war in diesem System daher nicht möglich. Alternativ könnten über eine Verringerung der Flussrate bzw. größere Schlauchdurchmesser bessere Ergebnisse erzielt werden; dies würde aber wiederum zu einer geringen Fließgeschwindigkeit und somit zu einer Sedimentation bzw. Deponierung von Magnetic Beads führen.

Da die Problematik des Einsatzes von reinen Serummatrices in mikrofluidischen Systemen bekannt ist, wurden bereits mehrere Systeme zum Einsatz von Magnetic Beads zur Extraktion und Konzentrierung von Analyten in mikrofluidischen Systemen beschrieben (GUO ET AL., 2006). Diese Problematik war in dem hier verwendeten fluidischen System mit den relativ großen Totalvolumen von ca. 2 ml und einem Probenvolumen von 0,5 ml nicht vorhersehbar. Um trotzdem ein fluidisches System mit magnetischer Detektion in einer Realmatrix nutzen zu können, musste eine magnetische Extraktion des Analyten aus

der Realmatrix und die anschließende Resuspendierung der abgetrennten Antigen-Antikörper-Magnetic-Beads-Konjugate in Messpuffer erfolgen.

Die Durchführung der Messung entspricht der Detektion in PBS-Puffer. Die Probe wurde ebenfalls für 1 h mit Antikörper und Magnetic Beads vorinkubiert und anschließend nicht direkt in das System eingeleitet, sondern zuerst magnetisch extrahiert und dann in PBS-Puffer resuspendiert. Diese Pufferlösung wurde dann durch die Messappparatur geleitet.

Die durchgeführte Kalibration zeigte einen ganz ähnlichen Kurvenverlauf für die magnetische Extraktion wie für die Detektion in PBS-Puffer. Auffällig ist die geringere Signalstärke und die höhere Standardabweichung der Einzelwerte. Dies ist wahrscheinlich ein Matrix- bzw. Probenhandhabungseffekt. Durch die magnetische Extraktion gibt es einen gewissen Verlust an Magnetic Beads. Außerdem kann es auch hier zu einer Bildung von größeren Komplexen bzw. einer Magnetisierung der Partikel kommen, sodass diese nicht mehr in vollem Umfang bindungsfähig sind. Durch den inhomogenen Verlust von Magnetic Beads bei Extraktion bzw. Überführung ergeben sich dementsprechend auch höhere Standardabweichungen.

Als linearer Messbereich des sigmoiden Kurvenverlaufes wurde 50-400 ng CRP pro ml identifiziert. Dieser Messbereich entspricht fast dem Messbereich der Detektion ohne magnetische Extraktion (25-400 ng/ml) und erlaubt auch für dieses System die Detektion des humanen CRPs aus Serumproben im Messbereich unter 1 µg/ml CRP.
Das Ergebnis des durchgeführten Intra-Assays ist tatsächlich noch etwas besser als bei der fluidischen Detektion ohne magnetische Extraktion, sowohl der Blindwert (0 ng CRP/ml) als auch die getesteten Messwerte zeigen einen niedrigeren Variationskoeffizienten. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit den deutlich höheren Standardabweichungen der Einzelmessungen der Kalibration; allerdings wurden die Tests zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt.

Während man bei diesem System aufgrund des Totalvolumens von ca. 2 ml nur von einer Fluidik sprechen kann, gibt es vielfältige Bestrebungen, Magnetic Beads auch in mikrofluidischen Anwendungen mit einem Totalvolumen deutlich unter 1 ml einzusetzen.

Die Möglichkeit, Magnetic Beads zum Transport von Flüssigkeiten oder Analytmolekülen in mikrochipbasierten Detektionssystemen wird z. B. von LEHMANN ET AL. (2007) gezeigt. Durch den Transport der Analyten über magnetische Kräfte kann sogar auf den Einsatz von Pumpen in Mikrokapillaren verzichtet werden.

CHANDLER ET AL. (2001) beschreiben ein automatisches System zur Extraktion und Anreicherung von *E. coli*-Zellen aus Hühnchen-Waschwasser (chicken carcass wash water, CCWW). Die Detektion der extrahierten *E. coli*-Zellen erfolgt per PCR oder DNA-Microarrays mit einer Detektionsgrenze von 10^3 cfu/ml, wobei bis zu 10 cfu/ml durch die magnetische Extraktion mit anschließendem Plattieren der Partikel auf Agarplatten nachgewiesen werden konnte. Die magnetische Extraktion funktioniert also auch in automatischen, fluidischen Systemen sehr zuverlässig.

Die Manipulation und anschließende Detektion von Magnetic Beads auf einem mikrofluidischen Chip mithilfe eines SQUID-Sensors gelang RAMADAN ET AL. (2004), allerdings ohne praktische Anwendung.

Ebenfalls erfolgreich bei der Verwendung von Magnetic Beads zur Extraktion eines Analyten und anschließender magnetischer Detektion mit einem GMR-Sensor waren EDELSTEIN ET AL. (1999). Ihr etablierter BARC-Sensor (Bead Array Counter) wurde erst zur Detektion von Bakterien über DNA-Sonden-Hybridisierung eingesetzt und hierfür auch mit komplexeren mikrofluidischen Systemen verwendet (MILLER ET AL., 2001). Mittlerweile wird auch der Einsatz dieses weitverbreiteten Chips zur immunologischen Detektion von Proteinen in mikrofluidischen Systemen gezeigt (MULVANEY ET AL., 2007). Hierbei gelang eine Detektion von Ricin A bis zu einer Konzentration von 7 ng/ml und *Staphylococcus* Entertoxin B bis zu einer Konzentration von 1 ng/ml.

Bei kritischer Betrachtung der Detektionssysteme sind die sehr sensitiven SQUID und GMR-Sensoren bei mikrofluidischen Anwendungen zur Detektion von Magnetic Beads im Vorteil. Zur Detektion von Magnetic Beads mit Induktionsspulen muss erst eine gewisse Menge der Magnetic Beads vorhanden sein. In mikrofluidischen Messkammern und miniaturisierten Systemen ist dies aber schwierig, weshalb auch im Rahmen dieser Arbeit mit einer etwas großvolumigeren Fluidik gearbeitet wurde. Auch die Detektion einzelner Magnetpartikel, die laut EDELSTEIN ET AL. (1999) mit einem GMR-Sensor möglich sein soll, ist mit einem Induktionsspulen-basierten Sensorsystem nicht möglich. Hier ist der im Rahmen dieser Arbeit realisierte einfache und robuste Systemaufbau deutlich sinnvoller.

Gerade der Nachweis bzw. die Quantifizierung einzelner Partikel wird in Verbindung mit der Durchflusszytometrie sehr interessant. PAMME ET AL. (2006) gelang die Trennung einer Mischung aus verschiedenen Magnetpartikeln basierend auf der Größe, Trägheit und Suszeptabilität der Partikel in einem mikrofluidischen System. Bei einer Beladung der verschiedenen Partikel mit unterschiedlichen Antikörpern und unter Einsatz einer magnetischen Quantifizierung könnten Mischungen von Zellen, z. B. aus einer Zellkultur, schnell und simpel separiert, extrahiert und quantifiziert werden. Hierdurch könnte auf den Einsatz eines sehr kostenintensiven FACS (fluorescene activated cell sorting) verzichtet werden.

Letztendlich stellt das etablierte fluidische CRP-Detektionssystem aber eine sinnvolle automatisierbare Alternative zur normalen Messmethode mit Magnetic Beads dar. Auch die erreichten Messbereiche sind zur normalen Messmethode vergleichbar und ebenfalls deutlich sensitiver als kommerziell erhältliche high-sensitivity ELISAs. Die Verwendung von Realmatrices wie z. B. Serum ist unter Einsatz der magnetischen Extraktion möglich. Weiterhin ist der realisierte Aufbau kompakt und robust genug für eine Anwendung im Sinne des point-of-care, was z. B. für einen laborintensiven SQUID-Sensor nicht gelten kann.

4.12 Genereller Vergleich der Sensortechnik

Bei einer generellen Charakterisierung einer Detektionsmethode muss zwischen der diagnostischen Leistungsfähigkeit und der zugrunde liegenden Technik unterschieden werden.

Betrachtet man die Sensitivität der vorgestellten Applikationen mit magnetischer Detektion, lässt sich ein Vergleich mit der Sensitivität typischer ELISAs vornehmen. Dies beobachten auch AYTUR ET AL. (2006) mit einem Hall-Effekt basierten magnetischen Sensor.

Je nach Applikation sind bereits kommerziell erhältliche ELISA-Systeme gleich sensitiv oder etwas besser. Die magnetische Detektion mit Induktionsspulen und dem ABICAP®-System ist auch in der Anwendung einem ELISA-basierten Testsystem vergleichbar. So

muss für jede Messung einer Probe zumindest eine kleine Kalibration des Sensors auf die Umweltbedingungen und Reagenzien erfolgen. Ein Kalibrations-unabhängiges Vermessen von Proben mit einer Standardkalibration ist nicht sinnvoll. Ein deutlicher Vorteil der magnetischen Detektion liegt aber in der gleichzeitigen Extrahierbarkeit des Analyten auch aus Probenmatrices, die für ELISA eventuell nicht zugänglich sind. Ein weiterer Vorteil der magnetischen Detektion liegt in der Robustheit und Unabhängigkeit der Messmethode. Ein Einsatz außerhalb des Labors ist ohne erkennbare Probleme möglich.

Bei dem Vergleich der Detektionsmethode ist die magnetische Detektion mit Induktionsspulen sicherlich weniger sensitiv als andere magnetische Detektionssysteme sowie andere mobile Multi-Pathogen-Detektionssysteme. Als typische Vertreter sind hier der CANARY-Sensor des Massachusetts Institute of Technology von RIDER ET AL. (2003) sowie ein PCR-Mikroarray der Food and Drug Association von TOMIOKA ET AL. (2005) zu nennen.

Im Bereich der magnetischen Detektion liegt der wissenschaftliche Fokus auf GMR und SQUID-basierten Sensoren. Ein weit verbreiteter GMR-basierter Sensor ist der BARC-Sensor des Naval Research Laboratory, USA von BASELT ET AL. (1998), EDELSTEIN ET AL. (2000), MILLER ET AL. (2001) und MULVANEY ET AL. (2007). Seine Anwendung wird für die Detektion von DNA, RNA sowie Proteinen und Zellen von Pathogenen beschrieben. Weitere GMR-basierte Detektionssysteme wurden von BREZSKA ET AL. (2004) und de BOER ET AL. (2007) vorgestellt.
Vorteil der GMR-basierten Detektion gegenüber der Detektion von Magnetic Beads mit Induktionsspulen liegt in der Sensitivität. Während GMR-Sensoren in der Lage sein sollen, einzelne Partikel nachzuweisen, gelingt die Detektion von Magnetic Beads mit Induktionsspulen erst ab höheren Konzentrationen. Zudem sind die aus der Festplattenindustrie bezogenen GMR-Mikrochips sehr kostengünstig. GMR-basierte Sensoren sind vergleichbar mobil einsetzbar wie Sensoren mit Induktionspulen.

Die vielleicht sensitivsten magnetischen Detektionsmethoden basieren auf den Einsatz von SQUIDs. Solche Systeme werden z. B. von NIELSEN ET AL. (2000) zur Detektion von Eiseneinlagerungen in der Leber bei Thalassemie eingesetzt. Es können aber auch Magnetic Beads damit detektiert werden, dies wird z. B. von RAMADAN ET AL. (2004) mit vorheriger Mikrochip-basierter magnetischer Extraktion gezeigt. Ein Nachteil der SQUIDs

liegt aber definitiv in ihren hohen Anforderungen und Kosten in Bezug auf Labortechnik zur Herstellung und Betrieb sowie der notwendigen totalen Abschirmung aller elektromagnetischer Wellen und metallischer Objekte.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Basierend auf der Methode der Frequenzmischung zur Detektion von Magnetic Beads in Form von Antikörper-konjugierten Labels konnten mehrere Detektionsassays entwickelt und bewertend verglichen werden. Hierbei lag der Fokus auf der Nutzung von kleinen Chromatographiehülsen (ABICAP®-System) mit einer Festphase aus einem Polyethylensinterkörper zur Einzelnutzung.
Diese Chromatographiehülsen wurden mit Extraktionsantikörpern beladen und die Probenflüssigkeit, teilweise nach Vorinkubation mit Magnetic Bead-Antikörperkonjugaten, hindurchgeleitet. Je nach Konzentration des Analyten in der Probenflüssigkeit wurden konzentrationsabhängige Mengen des Magnetic Bead-Antikörper-Konjugates an dem Polyethylensinterkörper der Chromatographiehülse zurückgehalten. Diese in der Säule befindlichen Magnetpartikel konnten mittels eines speziellen Detektionssystems per Frequenzmischung konzentrationsabhängig bestimmt werden.
Hierbei wurden neben verschiedenen Probenmatrices wie z. B. Puffer, Serum und Lebensmitteln, auch Methoden der sequentiellen und direkten Detektion mit Vorinkubation sowie ein fluidisches System verglichen.

Verschiedene Immobilisierungstechniken der Antikörper sowohl an den Polyethylensinterkörpern als auch an den Magnetic Beads wurden ebenfalls evaluiert und auf ihre Verwendbarkeit in diesem Detektionssystem hin optimiert. Hierbei zeigten vor allem die per adsorbtiver Beschichtung immobilisierten Antikörper sehr gute Ergebnisse. Dies ist zwar eine simple, aber auch eine einfach druchführbare und augenscheinlich sehr effektive Immobilisierungstechnik.

Auch ein Vergleich der verschiedenen, kommerziell erhältlichen Magnetic Beads mehrerer Anbieter wurde durchgeführt und auf die Verwendbarkeit in diesem Detektionsystem hin überprüft. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede der jeweiligen Magnetpartikel im Hinblick auf Oberflächenladung, Homogenität und Beladungsfähigkeit. Ein weiterer kritischer Punkt war die Verwendung von Maghemit in diesen Magnetpartikeln bzw. die oxidative Umwandlung des verwendeten Magnetits zu Maghemit. Vorhandenes Maghemit in den verwendeten Magnetpartikeln erzeugte wahrscheinlich die zu beobachtene, starke Signaldrift.

Trotzdem konnten verschiedene Partikeltypen unterschiedlicher Hersteller für eine Anwendung mit dem beschriebenen System der magnetischen Detektion identifiziert werden.
Der Vergleich verschiedener Prototypen des Magnet-Readers zeigte noch deutlich den wenig standardisierten Entwicklungsstand, was aber typisch für handgefertigte Modelle im Erprobungsstadium ist. Ungeachtet dessen waren die Systeme bereits vergleichbar und zeigten sehr ähnliche Leistungsdaten.

Die Etablierung eines Detektionssystems für *Mycobacterium tuberculosis* war aufgrund anscheinend nicht sterisch zu den Polyethylensinterkörpern und Magnetic Beads passender Antikörper-Geometrie nicht erfolgreich. Als Hauptursache ist somit der verwendete IgM-Antikörper zu identifizieren.

Sehr gut gezeigt werden konnte die Nutzung der ABICAP®-Säulen mit Magnetic Beads als detektierbare Labels für die Analytik des humanen CRP in Puffer und Realmatrices wie z.B. humanem Blutserum.
Hierbei konnten Detektionsgrenzen erreicht werden, die vergleichbar bzw. etwas besser als kommerziell verfügbare ELISA-Systeme waren. Dies zeigt eindrücklich die Sensitivität und reale Anwendbarkeit des Detektionsprinzips, vor allem in komplexen Probenmatrices. Im Vergleich zu anderen biosensorischen Systemen war das Prinzip der magnetischen Detektion vergleichbar sensitiv.

Analog hierzu war die Detektion von Antigenen von *Y. pestis* und *F. tularensis* sowohl in Puffern als auch in Realmatrices möglich. Die Detektionsmethodik wurde hierbei generisch auf diese bakteriellen Analyten übertragen und den jeweils optimalen Detektionsbedingungen angepasst.
Während die Detektionsgrenzen für die Detektion von *Y. pestis* vergleichbar zu bereits etablierten ELISA- und anderen beschriebenen Biosensor-Systemen war, konnten bei *F. tularensis* nur geringere Detektionsgrenzen erreicht werden. Hier waren bereits beschriebene Systeme deutlich sensitiver. Durch die Verwendung typischer Realmatrices wie z. B. Blutserum könnte sich hier aber trotzdem ein Vorteil des Detektionssystems zeigen.

Die Detektion von *S. typhimurium* erfolgte zuverlässig, allerdings auch mit hohen Detektionsgrenzen. Auch hier ist z. B. ein PCR-basiertes Detektionsystem deutlich sensitiver, genauso wie einige andere Antikörper-basierte Systeme.
Vorteilhaft ist aber eindeutig die Verwendbarkeit typischer Lebensmittel-Matrices als direkte Probenflüssigkeit mit magnetischer Extraktion und anschließender Detektion. So konnten Salmonellen in Milch, Eigelb und Chicken Carcass Wash Water detektiert werden.

Am Modell-Assay CRP ließ sich zusätzlich die Anwendbarkeit von Magnetic Beads und magnetischer Detektion in fluidischen Systemen zeigen. Dies stellt eine interessante Option für die Verwendung automatisierter und komplexer Systeme dar.
Hierbei ist die Prozessierung der tendenziell sedimentierenden Magnetic Beads die größte Herausforderung. Diese Problematik konnte mithilfe einer optimierten Flussgeschwindigkeit und der gezielten Verwendung von Luftblasen im System gelöst werden. Die Sensitivität des fluidischen Systems war hierbei nur geringfügig schlechter als die Nutzung der sequentiellen Detektionsmethode

Die generelle Prognose für diese spezielle Form der magnetischen Immundiagnostik ist durchaus positiv. Insbesondere die Kombinantion der Detektion mit magnetischer Extraktion aus schwer zugänglichen Medien erscheint als interessante und bisher mit anderen Systemen nicht mögliche Option.

Hier sollten weitere Studien zur Stablilität des Systems in der Routinediagnostik und die Erweiterung des Systems für andere diagnostische Applikationen priorisiert werden. Weiterhin ist die Verwendung qualitativ standardisierter Magnetic Beads und Antikörper für die Assay-Stabilität notwendig.

Der positive Ausblick für dieses Detektionssystem wird insbesondere unterstützt durch den robusten Aufbau des Handgerätes und die durch die Verwendung vorgefertigter ABICAP®-Säulen erreichbare Laborunabhängigkeit. Dies verspricht eine mögliche Anwendung im Feld sowie im Herstellungsalltag im Bereich der Lebensmitteldiagnostik zur Bestimmung unterschiedlichster Probenmatrices und Analyten.

Generell ist das Feld der Magnetic Beads in einer progressiven Entwicklung, wobei Detektionssysteme wie GMR, Induktionsspulen und SQUIDs bis hin zu Magnetresonanz getestet und etabliert werden. Dies geschieht sowohl im humanen in-vitro- als auch im in-vivo-Bereich als auch im therapeutischen Sektor mit der Leitfunktion der Hyperthermie. Man darf somit von den unscheinbaren Magnetic Beads in Zukunft noch viel Erwarten.

6 Anhang

Liste der verwendeten Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
APTES	Aminopropyltriethoxysilan
AU	Arbitrary units
Botox	Botulinum Toxin
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
CCWW	Chicken Carcass Wash Water
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton
DCC	Dicyclohexyl-carbodiimid
DIN	Deutsche Industrie Norm
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDC	Ethylcarbodiimid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystable
FNPA	Fluoro-nitro-phenyl-azid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GDA	Glutardialdehyd
GMR	Giant Magneto Resistance (Riesenmagnetwiderstand)
h	Stunde
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSAB	Hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoate
Ig	Immunglobulin
IMAC	Immobilized-metal affinity chromatography
in-vivo	im Körper
in-vitro	im Proben-Laborbereich
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IUPAC	International Union for Pure and Applied Chemistry
kb	Kilobasen(-paare)
LB	Luria-Bertani Medium
lcrV	low calcium response V
LAM	Lipo-arabinomannan
LPS	Lipopolysaccharid
M	mol/l
MAP	*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*
MES	Morpholino-ethan-sulfonsäure
min	Minute(n)
NHS	N-Hydroxy-Succimid
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion
PVA	Poly-Vinyl-Alkohol
QCM	Quartz-crystal-microscale
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Surface Plasmon Resonance (Oberflächenplasmonresonanz)

SQUID	Superconducting Quantum Interference Device (Supraleitende Quanteninterferenzeinheit)
SWW	Salad Wash Water
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFB	Terrific broth Medium
TSP	Tail spike protein
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

7 Literaturverzeichnis

Agarwal, A., Makker, A., Goel, S. K. Application of the PCR technique for a rapid, specific and sensitive detection of Salmonella spp. in foods. *Mol Cell Probes* **16** (4), 243-250 (2002).

Al-Bahrani, A. Z., Ammori, B. J. Clinical laboratory assessment of acute pancreatitis. *Clin Chem Acta* **362** (1-2), 26-48 (2005).

Anisimov, A. P., Lindler, L. E., Pier, G. B. Intraspecific diversity of Yersinia pestis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17,** 434–464 (2004).

Astalan, A. P., Ahrentorp, F., Johansson, C., Larsson, K., Krozer, A. Biomolecular reactions studied using changes in Brownian rotation dynamics of magnetic particles. *Biosens Bioelectron*. **19** (8), 945-951 (2004).

Augustin, J.C., Carlier, V. Lessons from the organization of a proficiency testing program in food microbiology by interlaboratory comparison: analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts. *Food Microbiol*. **23** (1),1-38 (2006).

Aytur, T., Foley, J., Anwar, M., Boser, B., Harris, E., Beatty, P. R. A novel magnetic bead bioassay platform using a microchip-based sensor for infectious disease diagnosis. *J Immunol Methods* **314**, 21-29 (2006).

Baxa, U., Steinbacher, S., Miller, S., Weintraub, A., Huber, R., Seckler, R. Interactions of phage P22 tails with their cellular receptor, Salmonella O-antigen polysaccharide. *Biophys J. 71* (4), 2040-2048 (1996).

Balasubramanian, S., Sorokulova, I.B., Vodyanoy, V.J., Simonian, A.L. Lytic phage as a specific and selective probe for detection of Staphylococcus aureus--A surface plasmon resonance spectroscopic study. *Biosens Bioelectron*. **22** (6), 948-955 (2007).

Baselt, D. R., Lee, G. U., Natesan, M., Metzger, S. W., Sheehan, P. E., Colton, R. J. A biosensor based on magnetoresistance technology. *Biosens Bioelectron.* **13**, 731-739 (1998).

Behr, M. A., Schurr, E. Mycobacteria in Crohn's disease: a persistent hypothesis. *Inflamm Bowel Dis.* **12** (10), 1000-1004 (2006).

Benner, G. E., Andrews, G. P., Byrne, W. R., Strachan, S. D., Sample, A. K., Heath, D. G., Friedlander, A. M. Immune response to Yersinia outer proteins and other Yersinia pestis antigens after experimental plague infection in mice. *Infect Immun.* **67** (4), 1922-1928 (1999).

Bevanger, L., Maeland, J. A., Naess, A. I. Competitive enzyme immunoassay for antibodies to a 43 kDa Francisella tularensis outer membrane protein for the diagnosis of tularemia. *J Clin Microbiol* **27**, 922-926 (1989).

Beyerbach, M., Gerlach, G. F., Homuth, M., Ortmann, G., Strutzberg, K., Kreienbrock, L. Überlegungen zur Festlegung eines geeigneten Cut-Off-Wertes für einen Sammelmilch-ELISA-Test auf Paratuberculose. In: Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Tuberkulose und des Referenzlabors für Paratuberkulose (2003).

Biagini, R. E., Sammons, D. L., Smith, J. P., MacKenzie, B. A., Striley, C. A. F., Robertson, S. A., Snawder, J. E., Quinn, C. P. Simultaneous measurement of specific IgG responses to five select agents. *Anal Bioanal Chem* **382**, 1027-1034 (2005).

Black, S. Kushner, I., Samols, D. C-reactive protein. JBC **47** (279), 48487-48490 (2004).

Bolton, F. J., Fritz, E., Poynton, S. Rapid enzyme-linked immunoassay for the detection of Salmonella in food and feed products: performance testing program. *J AOAC* **83**, 299-303 (2000).

Bora, U., Chugh, L., Nahar, P. Covalent immobilization of proteins onto photoactivated polystyrene microtiter plates for enzyme-linked immunosorbent assay procedures. *J Immunol Methods* 268 (2), 171-177 (2002).

Butler, J.E., Ni, L., Nessler, R., Joshi, K.S., Suter, M., Rosenberg, B., Chang, J., Brown, W.R., Cantarero, L.A. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. *J Immunol Methods* **150** (1-2), 77-90 (1992).

Broussard, L.A. Biological agents: weapons of warfare and bioterrorism. *Mol Diagn*. **6** (4), 323-333 (2001).

Bruckl, H., Panhorst, M., Schotter, J., Kamp, P. B., Becker, A. Magnetic particles as markers and carriers of biomolecules. *IEE Proc. Nanobiotechnol*. **152** (1), 41-46 (2005).

Brzeska, M., Panhorst, M., Kamp, P.B., Schotter, J., Reiss, G., Puhler, A., Becker, A., Bruckl, H. Detection and manipulation of biomolecules by magnetic carriers. *J Biotechnol*. **112** (1-2), 25-33 (2004).

Cai, H.Y., Lu, L., Muckle, C.A., Prescott, J.F., Chen, S. Development of a novel protein microarray method for serotyping Salmonella enterica strains. *J Clin Microbiol*. **43** (7), 3427-3430 (2005).

Cao, L. K., Anderson, G. P., Ligler, F. S., Ezzell, J. Detection of Yersinia pestis fraction 1 Antigen with a fiber optic biosensor. *J Clin Microbiol* **33** (2), 336-341 (1995).

Centers for Disease Control and Prevention. Level A laboratory procedures of identification of Yersinia pestis. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA (2001).

Chandler, D. P., Brown, J., Call, D. R., Wunschel, S., Grate, J. W., Holman, D. A., Olson, L., Stottlemyre, M. S., Bruckner-Lea, C. J. Automated immunomagnetic separation and microarray detection of E. coli O157:H7 from poultry carcass rinse. *Int J Food Microbiol* **70**, 143-154 (2001).

Chanteau, S., Rahalison, L., Ralafiarisoa, L., Foulon, J., Ratsitorahina, M., Ratsifasoamanana, L., Carniel, E., Nato, F. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *The Lancet* **361**, 211-216 (2003).

Chase, C. J., Ulrich, M. P., Wasieloski, L. P., Kondig, L. P., Garrison, J., Lindler, L. E., Kulesh, D. A. Real-time PCR assays targeting a unique chromosomal sequence of Yersinia pestis. *Clin Chem* **51**, 1778–1785 (2005).

Christensen, D. R., Hartman, L. J., Loveless, B. M., Frye, M. S., Shipley, M. A., Bridge, D. L., Richards, M. J., Kaplan, R. S., Garrison, J., Baldwin, C. D., Kulesh, D. A., Norwood, D. A. Detection of biological threat agents by real-time PCR: comparison of assay performance on the R.A.P.I.D., the LightCycler, and the Smart Cycler platforms. *Clin Chem* **52** (1),141-145 (2006).

Christodoulides, N., Mohanty, S., Miller, C.S., Langub, M. C., Floriano, P.N., Dharshan, P., Ali, M. F., Bernard, B., Romanovicz, D., Anslyn, E., Fox, P.C., McDevitt, J.T. Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva. *Lab Chip* **5** (3), 261-269 (2005).

Chemla, Y. R., Grossman, H. L., Poon, Y., McDermott, R., Stevens,, R., Alper, M. D., Clarke, J. Ultrasensitive magnetic biosensor for homogeneous immunoassay. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **97,** 14268–14272 (2000).

Clark, L.C. Monitoring and control of blood and tissue oxygen. *Transaction- American Society for Artificial Internal Organs* **2**, 41-48 (1956).

Clark, L.C. und Lyons, L. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* **102**, 29-45 (1962).

Clarke, J., Braginski, A. I. The SQUID Handbook. Kap. 2: Theory of SQUIDs. Wiley-VCH, Weinheim (2004).

Clarke, J.L., Anderson, J.L., Carlquist, J.F., Roberts, R.F., Horne, B.D., Bair, T.L., Kolek, M.J., Mower, C.P., Crane, A.M., Roberts, W.L., Muhlestein, J.B. Comparison of differing C-reactive protein assay methods and their impact on cardiovascular risk assessment. *Am J Cardiol.* 95 (1), 155-158 (2005).

Cook, K.L., Britt, J.S. Optimization of methods for detecting Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in environmental samples using quantitative, real-time PCR. *J Microbiol Methods* **69** (1), 154-160 (2007).

Cudjoe, K.S., Krona, R. Detection of Salmonella from raw food samples using Dynabeads anti-Salmonella and a conventional reference method. *Int J Food Microbiol.* **37** (1), 55-62 (1997).

Craighead, H. Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules. *Nature* **442** (7101), 387-393 (2006).

de Boer, B. M., Kahlman, J. A., Jansen, T. P., Duric, H., Veen, J. An integrated and sensitive detection platform for magneto-resistive biosensors. *Biosens Bioelectron*. **22** (9-10), 2366-2370 (2007).

Degener, I. Entwicklung von Methoden zur Immobilisierung an Polymersinterkörpern. Dissertation, Universität Bonn, 2004.

Dennis, D. T., Inglesby, T. V., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., Fine, A. D., Friedlander, A. M., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S. R., McDade, J. E., Osterholm, M. T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T. M., Russell, P. K., Tonat, K. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*. **285** (21), 2763-2773 (2001).

Diamandis, E.P. und Christopoulus, T.K. Immunoassay, Academic Press, San Diego, S. 579f (1996).

Dill, K., Stanker, L. H., Young, C. R. Detection of Salmonella in poultry using a silicon chip-based sensor. *J Biochem Biophys Methods* **41**, 61-67 (1999).

Dominici, R., Luraschi, P., Franzini, C. Measurement of C-reactive protein: two high sensitivity methods compared. J Clin Lab Anal. 18 (5), 280-284 (2004).

Draber, P., Draberova, E., Novakova, M. Stability of monoclonal IgM antibodies freeze-dried in the presence of trehalose. J Immunol Methods 181 (1), 37-43 (1995).

Dupuy, A. M., Lehmann, S., Cristol, J. P. Protein biochip systems for the clinical laboratory. Clin Chem Lab Med 43 (12), 1291-1302 (2005).

Edelstein, R. L., Tamanaha, C. R., Sheehan, P. E., Miller, M. M., Baselt, D. R., Whitman, L. J., Colton, R. J. The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents. *Biosens Bioelectron* **14**, 805-813 (1999).

Ejsing, L., Hansen, M. F., Menon, A. K., Ferreira, H. A., Graham, D. L., Freitas, P. P. Planar Hall effect sensor for magnetic micro- and nanobead detection. *Appl Phys Lett.* **84**, 4729–4731 (2004).

Erlinger, T.P., Platz, E.A., Rifai, N., Helzlsouer, K.J. C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer. *JAMA.* **291** (5), 585-590 (2004).

Eyigor, A., Carli, K. T., Unal, C. B. Implemention of real-time PCR to tetrathionate broth enrichment step of Salmonella detection in poultry. *Lett. Appl. Microbiol*. **34** (1), 37-41 (2002).

Fach, P., Gibert, M., Griffais, R., Popoff, M. R. Investigation of animal botulism outbreaks by PCR and standard methods. *FEMS Immunol Med Microbiol*. **13** (4), 279-285 (1996).

Fritsche, W. Mikrobiologie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. S. 135 (1999).

Fuentes, M., Mateo, C., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. Preparation of inert magnetic nano-particles for the directed immobilization of antibodies. *Biosens Bioelectron* **20**, 1380-1387 (2005).

Gambari R. Biospecific interaction analysis: a tool for drug discovery and development. *Am J Pharmacogenomics*. **1** (2), 119-35 (2001).

Glick, B. R., Pasternak, J. J. Molekulare Biotechnologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1995).

Goldbach, M. Entwicklung eines miniaturisierten elektrophoretischen Analysensystems auf Keramikbasis zur Bestimmung von Polyphenolen, Dissertation. Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Marburg (2006).

Goldbach, M., Axthelm, H., Keusgen, M. LTCC-based microchips for the electrochemical detection of phenolic compounds. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 120 (1), 346-351 (2006).

Gomes-Solecki, M. J., Savitt, A. G., Rowehl, R., Glass, J. D., Bliska, J. B., Dattwyler, R. J. LcrV capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Yersinia pestis from human samples. *Clin Diagn Lab Immunol* **12** (2), 339-346 (2005).

Grabarek, Z., Gergely, J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal Biochem* **185**, 131-135 (1990).

Grant, I. R. Mycobacterium paratuberculosis and milk. *Acta Vet Scand*. **44** (3-4), 261-266 (2003).

Green, R. J., Frazier, R. A., Shakesheff, K. M., Davies, M. C., Roberts C. J. Tendler, S.J.B. surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials* **21**, 1823-1835 (2000).

Grunow, R., Miethe, P., Conlan, W., Finke, E.-J., Friedewald, S., Porsch-Özcürümez, M. Rapid detection of Francisella tularensis by the immunoaffinity assay ABICAP in environmental and human samples. J Rapid Methods & Automation in Microbiology **16,** 30–54 (2008).

Guglielmo-Viret, V., Attrée, O., Blanco-Gros, V., Thullier, P. Comparison of electrochemiluminescence assay and ELISA for the detection of Clostridium botulinum type B neurotoxin. J Microbiol Methods **301** (1-2), 164-172 (2005).

Guilbault, G.G. and Montalvo, J. A urea specific enzyme electrode. *Journal of the American Chemical Society* **91**, 2164-2569 (1969).

Guntupalli, R., Hu, J., Lakshmanan, R. S., Huang, T. S., Barbaree, J. M., Chin, B. A. A magnetoelastic resonance biosensor immobilized with polyclonal antibody for the detection of Salmonella typhimurium. *Biosens Bioelectron*. **22** (7), 1474-1479 (2007).

Guo, S. S., Zuo, C. C., Huang, W. H., Peroz, C., Chen, Y. Response of super-paramagnetic beads in microfluidic devices with integrated magnetic micro-columns. *Microelectronic Engineering* **83**, 1655-1659 (2006).

Hainfeld, J.F., Powell, R.D. New frontiers in gold labeling. *J Histochem Cytochem*. **48** (4), 471-480 (2000).

Hall, E. H. On a new action of the magnet on electric currents. *Am J Math* **2**, 287-292 (1879).

Harris, N. B., Barletta, R. G. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev*. **14** (3), 489-512 (2001).

Hartmann, M. Neue Ansätze in der biomolekularen Interaktionsanalyse unter besonderer Berücksichtigung pharmazeutischer und lebensmittelchemischer Fragestellungen, Dissertation. Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn (2004).

Hartmeier, W. Immobilisierte Biokatalysatoren. Springer-Verlag, Berlin (1986).

Haukanes, B. I., Kvam, C. Application of magnetic beads in bioassays. *Biotechnology* **11**(1), 60-63 (1993).

d`Hérelle, F. Sur une microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C. R. Ac. Sciences* 165, 373f, (1917).

Hielm, S., Hyytia, E., Ridell, J., Korkeala, H. Detection of Clostridium botulinum in fish and environmental samples using polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol*. **31** (1-3), 357-365 (1996).

Hindson, B. J., McBride, M. T., Makarewicz, A. J., Henderer, B. D., Setlur, U. S., Smith, S. M., Gutierrez, D. M., Metz, T. R., Nasarabadi, S. L., Venkateswaran, K. S., Farrow, S. W., Colston, B. W., Dzenitis, J. M. Autonomous detection of aerosolized biological agents by multiplexed immunoassay with polymerase chain reaction confirmation. *Anal Chem*. **77** (1), 284-289 (2005).

Holländer, A., Keusgen, M., Krämer, J., Ferner, A. German Patent Application DE 102005002343 A1 (2005).

Homola, J., Sinclair, S. Y, Gauglitz, G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators* B **54**, 3-15 (1999).

Hu, W. P., Hsu, H.-Y., Chiou, A., Tseng, K. Y., Lin, H.-Y., Chang, G. L., Chen, S.-J. Immunodetection of pentamer and modified C-reactive protein using surface plasmon resonance biosensing. *Biosens Bioelectron* **21**, 1631-1637 (2006).

Ibraimi, F., Kriz, D., Lu, M., Hansson, L. O., Kriz, K. Rapid one-step whole blood C-reactive protein magnetic permeability immunoassay with monoclonal antibody conjugated nanoparticles as superparamagnetic labels and enhanced sedimentation. *Anal Bioanal Chem*. **384** (3), 651-657 (2006).

Ikeda, M., Yamaguchi, N., Tani, K., Nasu, M. Rapid and simple detection of food poisoning bacteria by bead assay with a microfluidic chip-based system. *J Microbiol Methods*. **67** (2), 241-247 (2006).

Israel, V. Role of the bacteriophage P22 tail in the early stages of infection. *J Virology* **18** (1), 361-364 (1976).

Janeway, C.A. und Travers, P. Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 634 (1995).

Jark, U., Ringene, I., Evanz, B., Gerlach, G., Beyerbach, M., Franz, B. Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *Vet Microbiol* **51**, 189-198 (1997).

June, G.A., Sherrod, P.S., Hammack, T.S., Amaguaña, R.M., Andrews, W.H. Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and rappaport-vassiliadis medium for recovery of Salmonella spp. from raw flesh, highly contaminated foods, and poultry feed: collaborative study. *J AOAC Int*. **79** (6), 1307-1323 (1996).

Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M. Medizinische Mikrobiologie. 9. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart. S. 243f (1997).

Keusgen, M. Biosensorische Methoden zur Quantitativen Bestimmung von Cysteinsulfoxiden. Shaker Verlag, Aachen, S. 152 (1999).

Keusgen, M. Biosensors: New approaches in drug discovery. *Naturwissenschaften* **89**, 433-444 (2002).

Khardori, N. Antibiotics--past, present, and future. *Med Clin North Am*. **90** (6), 1049-1076 (2006).

Ko, S., Grant, S. A. A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of Salmonella typhimurium. *Biosens Bioelectron*. **21** (7), 1283-1290 (2006).

Köhler, G. und Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256** (5517), 495-497 (1975).

Krause, H.-J., Zhang, Y., Wolters, N., Miethe, P., Plaksin, D. German Patent Application 10309132.7, (2003), European Patent Application WO 2004/077044 A1, (2004).

Krause, H.-J., Wolters, N., Zhang, Y., Offenhäusser, A., Miethe, P., Meyer, M., Hartmann, M., Keusgen, M. Magnetic particle detection by frequency mixing for immunoassay applications. *J Magn Magn Mat*. **311** (1), 436-444 (2007).

Kremer, J. Lebensmittelmikrobiologie. 4. Auflage, UTB-Verlag, Suttgart. S. 62ff (2002).

Kriz, C. B., Radevik, K., Kriz, D. Magnetic permeability measurements in bioanalysis and biosensors. *Anal Chem*. **68**, 1996-1970 (1996).

Kriz, K.,Gehrkea, J., Kriz, D. Advancements toward magneto immunoassays. *Biosens Bioelectron* **13** (7-8), 817-823 (1998).

Kriz, K., Ibraimi, F., Lu, M., Hansson, L., Kriz, D. Detection of C-Reactive Protein Utilizing Magnetic Permeability Detection Based Immunoassays. *Anal Chem*. **77** (18), 5920 – 5924 (2005).

Kulagina, N.V., Lassman, M.E., Ligler, F.S., Taitt, C.R. Antimicrobial peptides for detection of bacteria in biosensor assays. *Anal Chem*. **77** (19), 6504-6508 (2005).

Kumada, Y., Tokunaga, Y., Imanaka, H., Imamura, K., Sakiyama, T., Katoh, S., Nakanishi, K. Screening and characterization of affinity peptide tags specific to polystyrene supports for the oriented immobilization of proteins. *Biotechnol Prog* **22** (2), 401-405 (2006).

Kurosawa, S., Nakamura, M., Park, J.W., Aizawa, H., Yamada, K., Hirata, M. Evaluation of a high-affinity QCM immunosensor using antibody fragmentation and 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer. *Biosens Bioelectron*. **20** (6), 1134-1139 (2004).

Lehmann, U., de Courten, D., Vandevyver, C., Parashar, V. K., Gijs, M. A. M. On-chip antibody handling and colorimetric detection in a magnetic droplet manipulation system. *Microelectronic Engineering* **84**, 1669-1672 (2007).

Leonard, P., Säfsten, P., Hearty, S., McDonnell, B., Finlay, W., O`Kennedy, R. High troughput ranking of recombinant avian scFv antibody fragments from crude lysates using the Biacore A100. *J Immunol Methods* 323 (2), 172-179 (2007).

Li, J.J., Fang, C.H. C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular diseases. *Med Hypotheses.* 62 (4), 499-506 (2004).

Liedberg, B., Nylander, C., Lundström, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **4** (2), 299-304 (1983).

Lu, M., Ibraimi, F., Kriz, D., Kriz, K. A combination of magnetic permeability detection with nanometer-scaled superparamagnetic tracer and its application for one-step detection of human urinary albumin in undiluted urine. *Biosens Bioelectron*. **21** (12), 2248-2254 (2006).

Maciorowski, K. G., Herrera, P., Jones, F. T., Pillai, S. D., Ricke, S. C. Cultural and Immunological Detection Methods for Salmonella spp. in Animal Feeds - A Review. *Vet Res Commun*. **30** (2), 127-37 (2006).

Matz, H., Drung, D., Hartwig, S., Gross, R., Kötitz, R., Müller, W., Vass, A., Weitschies, W., Trahms, L. *Appl. Superconductivity* **6**, 577–583 (1998).

Marquette, C. A., Blum, L. J., State of the art and recent advances in immunoanalytical systems. *Biosens. Bioelectron*. **21** (8), 1424-1433 (2006).

Marrenbach, M. Herstellung und biotechnologische Nutzung von rekombinanten Phagenfilamenten. Diplomarbeit, Bonn, (2003).

Mazer, S.P., Rabbani, L.E. Evidence for C-reactive protein's role in (CRP) vascular disease: atherothrombosis, immuno-regulation and CRP. *J Thromb Thrombolysis*. 17 (2), 95-105 (2004).

Mazumdar, S. D., Hartmann, M., Kämpfer, P., Keusgen, M. Rapid method for detection of Salmonella in milk by surface plasmon resonance (SPR). *Biosens Bioelectron*. **22** (9-10), 2040-2046 (2007).

McKenna, S. L., Barkema, H. W., Keefe, G. P., Sockett, D. C. Agreement between three ELISAs for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in dairy cattle. *Vet Microbiol*. **114** (3-4), 285-291 (2006).

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*. **5** (5), 607-625 (1999).

Megens, M., Prins, M. Magnetic biochips: a new option for sensitive diagnostics. *J Magn Magn Mater*. **293**, 702–708 (2005).

Mendelson, M., Walters, S., Smith, I., Kaplan, G. Strain-specific mycobacterial lipids and the stimulation of protective immunity to tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. **85** (5-6), 407-413 (2005).

Mengeling, B. J., Turco, S. J. Microbial glycoconjugates. *Curr Opinion Struct Biol* **8**, 572-577 (1998).

Miao, W., Bard, A.J. Electrogenerated chemiluminescence. 80. C-reactive protein determination at high amplification with [Ru(bpy)3]2+-containing microspheres. *Anal Chem*. **76** (23), 7109-7113 (2004).

Miller, M. M., Sheehan, P. E., Edelstein, R. L., Tamanaha, C. R., Zhong, L., Bounnak, S., Whitman, L. J., Volton, R. J. A DNA array sensor utilizing magnetic microbeads and magnetoelectronic detection. *J Magn Magn Mater* **225**, 138-144 (2001).

Mollaret, H. H. Fifteen centuries of Yersiniosis. *Contrib Microbiol Immunol*. **13**, 1-4 (1995).

Montecucco, C., Molgo, J. Botulinal neurotoxins: revival of an old killer. *Curr Opin Pharmacol*. **3**, 274-279 (2005).

Mosbach, K., Danielsson, B. An enzyme thermistor. *Biochimica and Biophysica Acta* **364** (1)**,** 140-145 (1974).

Mozola, M.A. Genetics-based methods for detection of Salmonella spp. in foods. *J AOAC Int.* **89** (2), 517-529 (2006).

Müller-Schulte, D., Brunner, H. Novel magnetic microspheres on the basis of poly(vinyl alcohol) as affinity medium for quantitative detection of glycated haemoglobin. *J Chromatogr*. A **711** (1), 53-60 (1995).

Mulvaney, S. P., Cole, C. L., Kniller, M. D., Malito, M., Tamanaha, C. R., Rife, J. C., Stanton, M. W., Whitman, L. J. Rapid, femtomolar bioassays in complex matrices combining microfluidics and magnetoelectronics. *Biosens Bioelectron*, doi:10.1016/j.bios.2007.03.029 (2007).

Munjal, S. K., Boehmer, J., Beyerbach, M., Strutzberg-Minder, K., Homuth, M. Evaluation of a LAM ELISA for diagnosis of paratuberculosis in sheep and goats. *Vet Microbiol*. **103** (1-2), 107-114 (2004).

Munjal, S., Miethe, P., Netuschil, L., Struck, F., Maier, K., Bauermeister, C. Immunoassay-based diagnostic point-of-care technology for oral specimen. *Ann NY Acad Sci* **1098**, 486-489 (2007).

Nanduri, V., Balasubramanian, S., Sista, S., Vodyanoy, V.J., Simonian, A.L. Highly sensitive phage-based biosensor for the detection of beta-galactosidase. *Anal Chim Acta*. **589** (2), 166-172 (2007).

Nevas, M., Hielm, S., Lindstrom, M., Horn, H., Koivulehto, K., Korkeala, H. High prevalence of Clostridium botulinum types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol*. **72** (1-2), 45-52 (2002).

Nielsen, P., Engelhardt, R., Duerken, M., Janka, G. E., Fischer, R. Using SQUID biomagnetic liver susceptometry in the treatment of thalassemia and other iron loading diseases. *Transfusion Science* **23**, 257-258 (2000).

Nikitin, P. I., Vetoshko, P. M., Ksenevich, T. I. New type of biosensor based on magnetic nanoparticle detection. *J Magn Magn Materials* **311**, 445-449 (2007a).

Nikitin, P. I., Vetoshko, P. M., Ksenevich, T. I. Magnetic Immunoassays. *Sensor Letters* **5** (1), 296-299 (2007b).

O'Brien, T., Johnson, L. H., Aldrich, J. L., Allen, S. G., Liang, L. T., Plummer, A. L., Krak, S. J., Boiarski, A. A. The development of immunoassays to four biological threat agents in a bidiffractive grating biosensor. *Biosens Bioelectron*. **14** (10-11), 815-828 (2000).

Ogert, R. A., Brown, J. E., Singh, B. R., Shriver-Lake, L. C., Ligler, F. S. Detection of Clostridium botulinum toxin A using a fiber optic-based biosensor. *Anal Biochem*. **205** (2), 306-312 (1992).

Oh, B.-J. Kim, Y.-K., Park, K.-W., Lee, W.-H., Choi, J.-W. Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella typhimurium. *Biosens Bioelectron*. **19** (11), 1497-1504 (2004).

Olsen, E.V., Sorokulova, I.B., Petrenko, V.A., Chen, I.H., Barbaree, J.M., Vodyanoy, V.J. Affinity-selected filamentous bacteriophage as a probe for acoustic wave biodetectors of Salmonella typhimurium. *Biosens Bioelectron*. **21** (8), 1434-1442 (2006).

Olsvik, O., Popovic, T., Skjerve, E., Cudjoe, K.S., Hornes, E., Ugelstad, J., Uhlen, M. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Rev*. **7** (1), 43-54 (1994).

Pamme, N. Magnetism and microfluidics. *Lab Chip* **6** (1), 24-38 (2006).

Pamme, N., Eijkel, J. C. T., Manz, A. On-chip free-flow magnetophoresis: Separation and etection of mixtures of magnetic particles in continous flow. *J Magn Magn Mater* **307**, 237-244 (2006).

Petersen, J, M., Schriefer, M. E. Tularemia: emergence/re-emergence. *Vet Res*. **36** (3), 455-467 (2005).

Perry, R. D., Fetherston, J. D. Yersinia pestis--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* **10** (1), 35-66 (1997).

Petty, N.K., Evans, T.J., Fineran, P.C., Salmond, G.P. Biotechnological exploitation of bacteriophage research. *Trends Biotechnol* **25** (1), 7-15 (2007).

Petrenko, V. A., Smith, G. P. Phages from landscape libraries as substitute antibodies. *Protein Eng*. **13** (8), 589-592 (2000).

Petrenko, V.A., Sorokulova, I.B. Detection of biological threats. A challenge for directed molecular evolution. *J Microbiol Methods*. **58** (2), 147-168 (2004).

Popoff, M. Y. Antigenic formulas of the Salmonella serovars 8th ed. World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella, Institute Pasteur, Paris (2001).

Qian, W., Yao, D., Yu, F., Xu, B., Zhou, R., Bao, X., Lu, Z. Immobilization of antibodies on ultraflat polystyrene surfaces. *Clin Chem* **46** (9), 1456-1463 (2000).

Ramadan, Q., Samper, V., Poenar, D., Yu, C. On-chip micro-electromagnets for magnetic-based bio-molecules separation. *J Magn Magn Mater* **281**, 150-172 (2004).

Rider, T. H., Petrovick, M. S., Nargi, F. E., Harper, J. D., Schwoebel, E. D., Mathews, R. H., Blanchard, D. J., Bortolin, L. T., Young, A. M., Chen, J., Hollis, M. A. A B cell-based sensor for rapid identification of pathogens. *Science* **301** (5630), 213-215 (2003).

Riedel, S. Plague: from natural disease to bioterrorism. *Proc Bayl Univ Med Cent* **18** (2), 116-124 (2005).

Safarik, I., Safarikova, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagn Res Technol* **2** (1), 7.

Saleemuddin, M., Husain, Q. Concavalin A: a useful ligand for glycoenzyme immobilization--a review. *Enzyme Microb Technol*. **13** (4), 290-295 (1991).

Sandhu, A., Kumagai, Y., Lapicki, A., Sakamoto, S., Abe, M., Handa, H. High efficiency Hall effect micro-biosensor platform for detection of magnetically labeled biomolecules. *Biosens Bioelectron*.**22** (9-10), 2115-20 (2007).

Sarma. S. S., Nandini, S. Review of the recent ecotoxological studies on cladocerans. *J Environ Sci Health B* **41** (8), 1417-1430 (2006).

Schlemmer, H., Kürbitz, G., Miethe, P., Spieweck, M. Biological aerosol warner and analyser. *Proc SPIE 6218*, 62180E (2006).

Schmitt, P., Splettstösser, W., Porsch-Özcürümez, M., Finke, E.-J., Grunow, R. A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia. *Epidemiol Infect.* **133**, 759 (2005).

Schotter, J., Kamp, P. B., Becker, A., Puhler, A., Reiss, G., Bruckl, H. Comparison of a prototype magnetoresistive biosensor to standard fluorescent DNA detection. *Biosens Bioelectron*. **19** (10), 1149-1156 (2004).

Selvapandiyan, A., Stabler, K., Ansari, N. A., Kerby, S., Riemenschneider, J., Salotra, P., Duncan, R., Nakhasi, H. L. A novel semiquantitative fluorescence-based multiplexed polymerase chain reaction assay for rapid simultaneous detection of bacterial and parasitic pathogens from blood, *J Mol Diagnostics* **7,** 268–275 (2005).

Shanahan, F., O'Mahony, J. The mycobacteria story in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. **100** (7), 1537-1538 (2005).

Shichiri, M., Kawamori, R., Yamasaki, R., Hakai, Y. und Abe, H. Wearable artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor. *Lancet II* 1129-1131 (1982).

Shrive, A.K., Cheetham, G.M., Holden, D., Myles, D.A., Turnell, W.G., Volanakis, J.E., Pepys, M.B., Bloomer, A.C., Greenhough, T.J. Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nat Struct Biol*. **3** (4), 346-354.

Shriver-Lake, L.C., Donner, B., Edelstein, R., Breslin, K., Bhatia, S.K., Ligler, F.S. Antibody immobilization using heterobifunctional crosslinkers. *Biosens Bioelectron*. **12** (11), 1101-1106 (1997).

Spanová, A., Rittich, B., Horák, D., Lenfeld, J., Prodelalová, J., Suciková, J., Strumcová, S. Immunomagnetic separation and detection of Salmonella cells using newly designed carriers. *J Chromatogr A*. **1009** (1-2), 215-221 (2003).

Splettstoesser, W. D., Rahalison, L., Grunow, R., Neubauer, H., Chanteau, S. Evaluation of a standardized F1 capsular antigen capture ELISA test kit for the rapid diagnosis of plague. *FEMS Immunol Med Microbiol* **41** (2),149-155 (2004).

Splettstoesser, W. D., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Neubauer, H., Schuff-Werner, P. Diagnostic procedures in tularaemia with special focus on molecular and immunological techniques. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. **52** (6), 249-261 (2005).

Steinbacher, S., Baxa, U., Miller, S., Weintraub, A., Seckler, R., Huber, R. Crystal structure of phage P22 tailspike protein complexed with Salmonella sp. O-antigen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93** (20), 10584-10588 (1996).

Steingroewer, J., Bley, T., Bergemann, C., Boschke, E. Biomagnetic separation of Salmonella Typhimurium with high affine and specific ligand peptides isolated by phage display technique. *J Magn Magn Mat* **311**(1), 295-299 (2007).

Stratmann, J., Strommenger, B., Stevenson, K., Gerlach, G. F. Development of a peptide mediated capture PCR for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk. *J Clin Microbiol* **40**, 4244-4250 (2002).

Straub, T. M., Dockendorff, B. P., Quinonez-Diaz, M. D., Valdez, C. O., Shutthanandan, J. I., Tarasevich, B. J., Grate, J. W., Bruckner-Lea, C. J. Automated methods for multiplexed pathogen detection. *J Microbiol Methods.* **62** (3), 303-316 (2005).

Swanimathan, S., Eswaramoorthy, S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of Clostridium botulinum neutotoxin B. *Nat Struct Biol* **7**, 693-699 (2000).

Tan, W., Shelef, L. A. Automated detection of Salmonella spp. in foods. *J Microbiol Methods*. **37** (1), 87-91 (1999).

Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry* **71**(12), 2333-2348 (1999).

Thirumalapura, N. R., Mortin, R. J., Ramachandran, A., Malayer, J. R. Lipopolysaccharide microarrays for the detection of antibodies. *J Immunol Methods* **298**, 73-81 (2005).

Tindall, B. J., Grimont, P. A., Garrity, G. M., Euzeby, J. P. Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. *Int J Syst Evol Microbiol*. **55** (Pt 1), 521-524 (2005).

Tito, M. A., Miller, J., Griffin, K. F., Williamson, E. D., Titball, R. W., Robinson, C. V. Macromolecular organisation of the Yersinia pestis capsular F1 antigen: Insights from time-of-flight mass spectrometry. *Protein Sci* **10**, 2408-2413 (2001).

Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., McKenna, S. L., Keefe, G. P., Barkema, H. W. Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can Vet J*. **47** (9), 874-882 (2006).

Tomaso, H., Thullier, P., Seibold, E., Guglielmo, V., Buckendahl, A., Rahalison, L., Neubauer, H., Scholz, H. C., Splettstoesser, W. D. Comparison of hand-held test kits,

immunofluorescence microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay, and flow cytometric analysis for rapid presumptive identification of Yersinia pestis. *J Clin Microbiol* **45** (10), 3404-3407 (2007).

Tomioka, K., Peredelchuk, M., Zhu, X., Arena, R., Volokhov, D., Selvapandiyan, A., Stabler, K., Mellquist-Riemenschneider, J., Chizhikov, V., Kaplan, G., Nakhasi, H., Duncan, R. A multiplex polymerase chain reaction microarray assay to detect bioterror pathogens in blood. *J Mol Diagn*. **7** (4), 486-494 (2005).

Turner, A. P. F., Karube, I., Wilson, G. S. Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford University Press, Oxford, S. 770f (1987).

van Roermund, H. J., Bakker, D., Willemsen, P. T., de Jong, M. C. Horizontal transmission of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in cattle in an experimental setting: Calves can transmit the infection to other calves. *Vet Microbiol*. **122** (3-4), 270-29 (2007).

Vermeire, S., Van Assche, G., Rutgeerts, P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. **10** (5), 661-665 (2004).

Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A., Gruppen, H. Saponins, classification and occurence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **68** (3), 275-297 (2007).

Vinogradov, E., Perry, M. B., Conlan, J. W. Structural analysis of Francisella tularensis lipopolysaccharide. *Eur J Biochem*. **269** (24), 6112-6118 (2002).

Voelkl, K. P., Opitz, N. und Lubbers, D.W. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie* **301**, 162-163 (1980).

Vogel, H. Gerthsen Physik: Kurzer Überblick über den Paramagnetismus. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 18. Auflage, S. 390f (1995).

Wagner, R.D. Efficacy and food safety considerations of poultry competitive exclusion products. *Mol Nutr Food Res*. **50** (11), 1061-1071.

Wang J. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst*. **130** (4), 421-426 (2005).

Wee, K.W., Kang, G.Y., Park, J., Kang, J.Y., Yoon, D.S., Park, J.H., Kim, T.S. Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using piezoresistive self-sensing micro-cantilevers. *Biosens Bioelectron*. **20** (10), 1932-1938 (2005).

Winterhoff, C., Beyerbach, M., Homuth, M., Strutzberg, K., Gerlach, G. F. Establishment and evaluation of an ELISA fort he detection of antibodies in milk against Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* **109**, 230-234 (2002).

Wu, J.T. "Quantitative immunoassay: A practical guide for assay establishment, troubleshooting and clinical application", *American Association for Clinical Chemistry, Inc*., Washington, 255 f. (2000).

Wu, J. T. Y., Wong, L. S. J., Bowlby, E. E. An Automated High-Throughput Screening Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Johne's Disease Antibodies in Bovine Serum. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, **11** (5), 323-330 (2006).

Yang, L., Li, Y. Detection of viable Salmonella using microelectrode-based capacitance measurement coupled with immunomagnetic separation. *J Microbiol Methods*. **64** (1), 9-16 (2006).

Yoshioka, D. The Quantum Hall Effect. Springer Verlag, Berlin. S. 7ff (2002).

Zavialov, A. V., Berglund, J., Pudney, A. F., Fooks, L. J., Ibrahim, T. M., MacIntyre, S., Knight, S. D. Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from Yersinia pestis: preserved folding energy drives fiber formation. *Cell.* **113** (5), 587-596 (2003).

Zynio, S.A., Samoylov, A.V., Surovtseva, E.R., Mirsky, V.M., Shirshov, Y.M. Bimetallic layers increase sensitivity of affinity sensors based on surface plasmon resonance. *Sensors* **2**, 62-70 (2002).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Martin Heinz Friedrich Meyer
Geburtstag:	09.11.1978, in Mülheim an der Ruhr
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Schule und Zivildienst

1985-1998	Besuch der Grundschule Lierberg und des Gymnasium Broich in Mülheim an der Ruhr mit dem Abschluss Abitur
1998-1999	Zivildienst

Studium

1999-2004	Studium zum Diplom-Biologen an der RWTH Aachen, Fachrichtung Biotechnologie
2005-2007	Wissenschaftlicher Angestellter an der Universität Marburg, FB Pharmazie
2005-2008	Promotionsstudium an der Universität Marburg, Fachrichtung Pharmazie, AG Prof. Keusgen
2006-2008	Studium zum Master of Business Administration (MBA) an der FernUniversität Hagen

Beruf

seit 2008	angestellt bei Miltenyi Biotec GmbH, Abteilung Clinical Products, Bergisch Gladbach