

Strukturelle und kinetische Untersuchungen  
zur Entwicklung und Optimierung von  
Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am  
Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden

Michael G. Weller

Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik  
Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

---

STRUKTURELLE UND KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN  
ZUR ENTWICKLUNG UND OPTIMIERUNG VON  
HAPTEN-ENZYMIMMUNOASSAYS (ELISAS)  
AM BEISPIEL DER BESTIMMUNG VON TRIAZINHERBIZIDEN

---

Michael G. Weller

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Chemie, Biologie und  
Geowissenschaften der Technischen Universität München zur Erlangung des  
akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. F. Baumgärtner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schuster
3. Univ.-Prof. Dr. B. Hock

Die Dissertation wurde am 6.11.1992 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät Chemie, Biologie und Geo-  
wissenschaften am 7.12.1992 angenommen.

---

Der Irrtum wiederholt sich immerfort in der Tat.  
Deswegen muß man das Wahre unermüdlich in  
Worten wiederholen.

Johann Wolfgang v. Goethe <sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Maximen und Reflexionen, Aus Kunst und Altertum 1826.

## DANKSAGUNGEN

---

*Diese Arbeit wurde in der Zeit von August 1989 bis Oktober 1992 unter der Leitung von Herrn o. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner am Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik der Technischen Universität München durchgeführt.*

Herr Prof. Nießner schuf durch die Bereitstellung technischer und wissenschaftlicher Einrichtungen die grundlegende Basis für die Durchführung der vorliegenden Arbeit. Fruchtbare Diskussionen mit ihm waren mir eine stetige Motivation, noch tiefer in die Grundlagen der Immunoassays einzudringen. Für sein Engagement, die fachliche Unterstützung und finanzielle Förderung bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. L. Weil danke ich für die wissenschaftliche Betreuung. Die wohlwollende Beurteilung meiner Tätigkeit trug zu einem erheblichen Anteil zur Kontinuität dieser Arbeit bei.

Der Technischen Universität München bin ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums zu besonderem Dank verpflichtet. Wesentliche Teile dieser Arbeit konnten mit Hilfe dieser Förderung realisiert werden.

Dem Kreis der Freunde des Instituts für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München e. V. danke ich für die Verleihung eines Förderpreises, der mich ermutigt hat, den eingeschlagenen Weg konsequent weiterzugehen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Unterstützung der Forschergruppe "Serologischer Nachweis von Pestiziden und deren Metaboliten im Wasserkreislauf", die die Grundlage für die hier vorgestellte Arbeit gebildet hat.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben meine Praktikanten entscheidend beigetragen: S. Vollmuth, A. Huber, F. Schirmmacher, P. Winkler und T. Klein danke ich hiermit für die geleistete Arbeit, die zahlreichen Anregungen und interessanten Diskussionen.

Kooperation ist ein integraler Bestandteil interdisziplinärer Forschung. Daher bin ich allen zu großem Dank verpflichtet, die zu einem positiven Verlauf gemeinsamer Projekte beigetragen haben. Hier möchte ich die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. B. Hock (Lehrstuhl für Botanik, TU München, Weihenstephan) hervorheben, die durch die Herstellung von Triazin-Antikörpern und durch Informationsaustausch diese Arbeit erst möglich gemacht hat. Namentlich möchte ich Herrn Dr. T. Giersch, Frau Dr. C. Wittmann und Frau Dr. S. Wüst nennen.

Besonders erfreulich war die Zusammenarbeit mit Herrn J. Mangler (NMI, Reutlingen, Arbeitsgruppe Dr. Schloßhauer) bei einem Projekt zur Herstellung von monoklonalen Triazin-Antikörpern.

## DANKSAGUNGEN

---

Entscheidenden Anteil am Gelingen dieser Arbeit hat auch die Arbeitsgruppe Dr. J.-M. Schlaeppli (Ciba-Geigy AG, Basel), die mir monoklonale Antikörper zur Verfügung gestellt hat. Auch für die sonstige Hilfestellung der Mitarbeiter der Ciba-Geigy AG, insbesondere von Herrn Dr. Ramsteiner, sei hier gedankt.

Vielen Dank auch Herrn Prof. Verschoor (Universität Pretoria), der mir monoklonale Triazin-Antikörper zu Testzwecken überlassen hat.

Herrn Dr. D. Knopp (TU München) danke ich für die Überlassung von Pyren-Antikörpern, seinen Mitarbeitern K. Meisenecker und G. Matuszczyk für hilfreiche Diskussionsbeiträge.

Nicht zu vergessen ist die Leistung von Agathe und ihren vielen namenlosen Verwandten, ohne die kein einziger Antikörper produziert und kein immunologisches Experiment durchgeführt worden wäre.

Für Sachspenden möchte ich der Degussa AG (Triazinderivate), der Henkel AG (Alkylglucosid) und der Röhm GmbH (wasserlösliche Polymere) danken.

Mein Dank gilt auch Frau B. Silbernagel (TU München) für die sorgfältig durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen.

In diesem Zusammenhang sind auch die Messungen mittels GC-MS von C. Zwiener (TU München) und mittels GC-NPD von R. J. Schneider (TU München) zu erwähnen. Besonderen Dank für die prompte Erledigung!

Frau K. Vonlanthen möchte ich für die kolorimetrischen und iodometrischen Wasserstoffperoxid-Bestimmungen danken.

Herrn L. Müller (Universität Dortmund) verdanke ich Hinweise zur Herstellung von Triazincarbonsäureestern.

Herrn Dr. T. Bausch danke ich insbesondere für die Unterstützung bei der Suche nach historischen Schriften zum Thema Immunologie.

Meinen Kollegen B. Edelmann und K.-J. Huber (TU München) sei für die freundliche Unterstützung und interessante Anregungen gedankt.

Dank auch an U. Panne (TU München), der durch wertvolle Diskussionen, z.B. zum Thema Statistik, und einen regen Informationsaustausch einiges zu der vorliegenden Arbeit beigetragen hat.

## DANKSAGUNGEN

---

O. Schäfer (TU München) danke ich für kollegiale Hilfe in verschiedenen Bereichen. Besonders hervorheben möchte ich seine kompetente Unterstützung in Computerfragen.

Kaum zu überschätzen ist die Bedeutung eines guten Teams: Deshalb möchte ich an dieser Stelle meinen ELISA-Kollegen R. J. Schneider, P. Ulrich und C. Keuchel für ihre kooperative und freundschaftliche Zusammenarbeit danken. Sie haben entscheidenden Anteil am positiven Klima in der Arbeitsgruppe. Besondere Erwähnung muß der erhebliche Aufwand bei der Korrektur dieser Arbeit finden, den sie ohne Murren auf sich genommen haben - dafür besonderen Dank! In diesem Zusammenhang kann ich auch meinem ehemaligen Kollegen T. Ruppert für die freundliche Unterstützung danken.

Hierin eingeschlossen seien auch alle nicht explizit Erwähnten, die durch Worte oder Taten zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Letztendlich möchte ich meinen Eltern für ihr Vertrauen und ihre stetige Ermutigung und meinem Bruder für die tatkräftige Mithilfe danken.

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>I.</b>	<b>EINFÜHRUNG</b>	<b>1</b>
1	Ein Blick auf die historische Entwicklung	1
2	Was ist ein Immunoassay?	4
3	Antikörper	11
4	Enzymtracer	14
5	Label	16
6	Trägermaterialien	18
7	Puffer und Enzymsubstrate	19
8	Messung und Auswertung	21
9	Triazinherbizide	24
10	Immunoassays in der Medizin	28
11	Immunoassays in der Umweltanalytik	29
12	Triazin-Immunoassays	31
<b>II.</b>	<b>THEORIE</b>	<b>33</b>
1	Kinetik von Enzymimmunoassays	33
1.1	Allgemeines	33
1.2	Reaktionsordnungen	34
1.3	Dissoziationskonstanten	35
1.4	Assoziationskonstanten	35
1.5	Gleichgewichtskonstanten	36
1.6	Diffusion	44
1.7	Konzentrationsmessungen	45
1.8	Adsorptionseffekte	46
1.9	Temperatureffekte	47
2	Strukturelle Aspekte	47
2.1	Allgemeines	47
2.2	"Spacer Recognition"	48
2.3	Homologe und heterologe Tests	49
2.4	Schwach bindende Tracer	51
2.5	Spacerlänge	51
2.6	Anbindungsstelle des Spacers	53
2.7	Auswahl der immunogenen Struktur	53
3	Sensitivität	59
3.1	Allgemeines	59
3.2	Strukturelle Überlegungen	60
3.3	Kinetische Überlegungen	61
3.4	Testdesign	61
3.5	Sonstige Einflüsse	62

---

<b>4</b>	<b>Selektivität</b> . . . . .	<b>64</b>
4.1	Allgemeines . . . . .	64
4.2	Definitionen der Kreuzreaktion . . . . .	64
4.3	Polyklonale oder monoklonale Antikörper? . . . . .	70
4.4	Das Matrixproblem . . . . .	71
4.5	"Gruppenspezifische" und "monospezifische" Immunoassays . .	72
4.6	Verbesserung der Selektivität . . . . .	73
<b>5</b>	<b>Geschwindigkeit des Tests</b> . . . . .	<b>74</b>
5.1	Allgemeines . . . . .	74
5.2	Einflußgrößen . . . . .	75
5.3	Applikationen . . . . .	76
<b>6</b>	<b>Simulation eines Immunoassays</b> . . . . .	<b>76</b>
6.1	Allgemeines . . . . .	76
6.2	Kinetische und mathematische Grundlagen . . . . .	77
6.3	Durchführung . . . . .	78
6.4	Kontrollen . . . . .	78
<b>7</b>	<b>Synthesen von Immunoassay-Komponenten</b> . . . . .	<b>79</b>
7.1	Allgemeines . . . . .	79
7.2	Synthesen der Triazinderivate . . . . .	80
7.3	Aktivierung des Haptens . . . . .	83
7.4	Kopplung des Haptens . . . . .	86
7.5	Synthese von hydrophilen Derivaten . . . . .	87
7.6	Reinigung . . . . .	88
7.7	Reinheitskontrolle . . . . .	88
7.8	Strukturanalyse . . . . .	89
<b>III.</b>	<b>ZIELE UND AUFGABENSTELLUNG</b> . . . . .	<b>93</b>



<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	95
<b>1</b>	<b>Kinetik von Enzymimmunoassays</b>	95
1.1	Allgemeines	95
1.2	Reaktionsordnungen	95
1.3	Dissoziationskonstanten des Tracers	99
1.4	Dissoziationskonstanten des Analyten	109
1.5	Assoziationskonstanten	112
1.6	Gleichgewichtskonstanten	115
1.7	Konzentrationsmessungen	127
1.8	Adsorption und Desorption	131
1.9	Inverse Eichkurven	133
1.10	Zwischenwaschen	137
1.11	Schlußfolgerungen	139
<b>2</b>	<b>Strukturelle Aspekte</b>	142
2.1	Bridge Recognition	142
2.2	Affinität des Tracers	149
2.3	Verunreinigungen des Antikörpers	163
2.4	Verunreinigungen des Tracers	169
2.5	Schlußfolgerungen	171
<b>3</b>	<b>Sensitivität</b>	174
3.1	Allgemeines	174
3.2	Verdünnungsreihen	174
3.3	Inkubationszeiten	179
3.4	Die Verwendung des richtigen Antikörpers	187
3.5	Die Verwendung des richtigen Tracers	188
3.6	Die Verwendung des richtigen Markers	193
3.7	Veränderungen des Testdesigns	194
3.8	Unspezifische Effekte	195
3.9	Reinheit der Standards	196
3.10	Schlußfolgerungen	197
<b>4</b>	<b>Selektivität</b>	198
4.1	Beeinflussung durch den pH-Wert	198
4.2	Beeinflussung durch Inkubationszeiten	202
4.3	Schlußfolgerungen	207
<b>5</b>	<b>Herstellung von monoklonalen Antikörpern</b>	208
5.1	Allgemeines	208
5.2	Screening	209
5.3	Antikörper-Charakterisierung	212
5.4	Schlußfolgerungen	216

---

<b>6</b>	<b>Synthesen von Immunoassay-Komponenten</b>	217
6.1	Synthese von Triazin-Derivaten	217
6.2	Aktivierung von Triazin-Carbonsäuren	217
6.3	Kopplung von Haptenen an Peroxidase	218
6.4	Reinigung von Enzymtracern	218
6.5	Kopplung von Haptenen an Carrier-Moleküle	219
6.6	Synthese von hydrophilen Spacern	220
6.7	Schlußfolgerungen	222
<b>7</b>	<b>Sonstige Ergebnisse</b>	222
7.1	Eichkurven diverser Triazin-ELISAs	222
7.2	Absorption (403 nm) verschiedener Tracer	227
7.3	Enzymaktivität verschiedener Tracer	227
7.4	Tests zur Stabilisierung von Peroxidase-Tracern	229
7.5	Stabilisierung der Substratlösung	232
7.6	Stabilisierung des Antikörpers	235
7.7	Interne Standards für die Gaschromatographie	237
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	239
<b>VI.</b>	<b>AUSBLICK</b>	242
<b>VII.</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	243
<b>1</b>	<b>Verwendete Geräte</b>	243
<b>2</b>	<b>Verwendete Chemikalien</b>	243
<b>3</b>	<b>Verzeichnis der Antikörper und Tracer</b>	247
<b>4</b>	<b>Puffer und Stammlösungen</b>	249
<b>5</b>	<b>Standard-Testvorschriften</b>	250
5.1	ELISA	250
5.2	Pseudohomogener Test	253
5.3	Inverse Eichkurven	253
5.4	Dissoziationsexperimente (Tracer)	253
5.5	Dissoziationsexperimente (Analyt)	254
5.6	Assoziationsexperimente	254
5.7	Tracer-Bindungsverhalten	254
5.8	Screening von monoklonalen Antikörpern	254
5.9	Stabilisierung (Tracer)	255
5.10	Messung der Enzymaktivität (Peroxidase)	255

<b>6</b>	<b>Synthesen</b>	256
6.1	Synthesevorschrift für symmetrische Triazine	256
6.2	Synthesevorschrift A für unsymmetrische Triazine	256
6.3	Synthesevorschrift B für unsymmetrische Triazine	257
6.4	Synthesevorschrift C für unsymmetrische Triazine	257
6.5	Synthese von i-Pr/Et/1,3DAP	258
6.6	Synthese von t-Bu/Et/C6 und i-Pr/Et/C6	259
6.7	Synthese von i-Pr/Et/C6	259
6.8	Synthese von i-Pr/Cl/C6	259
6.9	Synthese von i-Pr/Cl/C3	260
6.10	Synthese von c-Pr/Cl/C6 (teure Amine)	260
6.11	Synthese von Et/Cl/C6 (gasförmige Amine)	261
6.12	Synthese von i-Pr/Cl/C6-C6	261
6.13	Synthese von i-Pr/Cl/C6-C2	261
6.14	Synthese von i-Pr/Cl/C11	262
6.15	Synthese von i-Pr/SMe/C6	262
6.16	Synthese von i-Pr/Et/3MPS und t-Bu/Et/3MPS	263
6.17	Synthese von i-Pr/OH/C6 und t-Bu/OH/C6	263
6.18	Synthese von t-Bu/Et/OH und Et/Et/OH	263
6.19	Synthese von H/Cl/C6 und H/Cl/C11	264
6.20	Synthese von H/OH/C6 und H/OH/C11	265
6.21	Synthese von Cl/C6/C6	265
6.22	Synthese des hydrophilen Spacers	265
6.23	Synthese von i-Pr/Cl/EDA-DGS	266
6.24	Synthese von i-Pr/Cl/Cl	267
6.25	Tracersynthese A	267
6.26	Tracersynthese B	267
6.27	Tracersynthese C	268
6.28	Tracersynthese D	268
6.29	Dichlorprop-Tracer	268
6.30	Pyren-Tracer	269
6.31	Desalkyltracer (H/Cl/C6)	269
6.32	"Monotracer" (t-Bu/Et/C6)	269
6.33	Hydrazidtracer (t-Bu/Et/C6)	269
6.34	Multihapten-Immunogen (BSA)	270
6.35	Multihapten-Immunogen (Hämocyanin)	270
6.36	Multihapten-Tracer ("MIX10")	271
6.37	Herstellung einer Peroxidase-Affinitätsmatrix	271
6.38	Triazincarbonsäure-Methylester	271

---

<b>7</b>	<b>Dünnschichtchromatographie</b>	<b>271</b>
7.1	Methode DC (I)	271
7.2	Methode DC (II)	272
7.3	Methode DC (III)	272
7.4	Methode DC (IV)	272
7.5	Methode DC (V)	272
7.6	Methode DC (VI)	272
7.7	Methode DC (VII)	273
7.8	Methode DC (VIII)	273
<b>VIII.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>275</b>
1	Triazin-Kurznamenklatur	275
2	Alphabetische Liste der Abkürzungen	276
3	Verzeichnis der Tabellen	278
<b>IX.</b>	<b>GLOSSAR</b>	<b>279</b>
<b>X.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>281</b>

## I. EINFÜHRUNG

## 1 Ein Blick auf die historische Entwicklung

Vom griechischen Geschichtsschreiber THUKYDIDES [1] sind Berichte vom Ausbruch der Pest in Athen 430 v.Chr. überliefert worden:

*"Mehr Mitleid hatten doch noch die Geretteten mit den Sterbenden und Leidenden, weil sie alles bereits kannten und selbst nun in Sicherheit waren; denn zweimal befahl sie denselben nicht, zumindest nicht mit tödlichem Ausgang. Sie wurden glücklich gepriesen von den anderen und hegten auch selbst in der übergroßen Freude des Augenblicks für alle Zukunft die unbeschwerte Hoffnung, es könnte ihnen nie mehr eine andere Krankheit den Tod bringen."*

Obwohl sich dieser allgemeine Optimismus aus heutiger Sicht als ungerechtfertigt erwiesen hat, kann diese Beschreibung als erster schriftlicher Bericht über Immunität gegen Krankheiten gelten. Ungefähr 500 Jahre später wurden in Indien Methoden zur Impfung gegen Pocken entwickelt [2]. Durch virushaltiges Material, das in die Haut des Oberarms eingepflegt wird, kann man eine mildere Form der Krankheit auslösen, die Schutz gegen die tödliche Infektion bietet (Variolation) [3]. 1721 führte der schottische Arzt MAITLAND die Variolation auch in Westeuropa ein. JENNER [4] gelangen 1796 erstmals erfolgreiche Impfungen mit den ungefährlicheren Kuhpocken-Viren. Systematische Untersuchungen der Immunität wurden jedoch erst Ende des 19. Jahrhunderts angestellt. BEHRING und KITASATO [5] interpretierten die unterschiedliche Anfälligkeit verschiedener Individuen gegenüber pathogenen Erregern als Resultat einer "Immunisierung", die sich im Serum nachweisen ließ. Dies führte zur ersten medizinischen Anwendung von Immunsereen zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten, sowie zur Etablierung von "Schutzimpfungen".

Einen wichtigen Markstein in der Geschichte der Immunologie bildet die "Seitenkettentheorie" von EHRLICH (1897) [6]. Er postulierte die Existenz einer "haptophoren" und einer "toxophoren" Gruppe am Immunogen, die, wie Substituenten (Seitenketten) an einem Benzolring, an einen zentralen Molekülteil gebunden sind. Die "haptophore" Gruppe wird nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip an einem Rezeptor einer Zelle gebunden, wogegen die "toxophore" Gruppe die Giftigkeit einer Substanz verursacht. EHRLICH vermutete, daß Zellen, die ein Antigen gebunden haben, durch dessen toxische Wirkung abgetötet oder zumindest in ihrer Funktion gestört werden. Später schlug er den Begriff "Zellreiz" vor. Der Körper versuche jedoch, diesen Schaden zu reparieren und sogar zu überkompensieren. Es würden nun mehr Rezeptoren der betreffenden Art hergestellt, was die immunisierende Wirkung eines Antigens erklärt. Die durch Überkompensierung zu reichlich produzierten Rezeptoren (Antikörper) würden letztlich ins Blut abgegeben.

Die Selektivität von Immunsereen wurde schon in den 20iger Jahren zur Routineanalytik von Proteinen genutzt. 1933 schreibt LANDSTEINER [7]:

*Anhangsweise soll noch auf die Anwendungen der serologischen Eiweißreaktionen hingewiesen werden, die so elektiv und empfindlich sind, daß sie mit Leichtigkeit Hundertstel von Milligrammen eines bestimmten Proteins nachzuweisen gestatten.*

Die Experimente von LANDSTEINER<sup>2</sup> [8] zur Immunisierung mit synthetischen Hapten-Konjugaten<sup>3</sup> gelten allgemein als der erste Brückenschlag zwischen Chemie und Immunologie. Er erkannte erstmals die chemische Selektivität von Antiseren, z.B. die Fähigkeit Isomere oder sogar Enantiomere [9] zu unterscheiden. In einem verallgemeinerten Sinn kann LANDSTEINER sogar als Erfinder des Haptenimmunoassays gelten. 1936 publizierte er zusammen mit VAN DER SCHEER eine Arbeit über Kreuzreaktionen [10]. In einem Abschnitt über "Inhibition Tests" wurde der Einfluß von Phenylderivaten auf die Präzipitatt-Bildung von Antiseren und Azoproteinen untersucht. Zwar stand noch keine empfindliche Markierungsmöglichkeit zur Verfügung, trotzdem sind alle Merkmale eines kompetitiven Immunoassays vorhanden.

In einer Auseinandersetzung mit EHRLICH behauptete ARRHENIUS [11] schon 1904, daß immunologische Reaktionen vollständig mit physikochemischen Gesetzen beschrieben werden könnten. Er erkannte die Reversibilität der Antikörper/Antigen-Reaktionen und die Möglichkeit das Massenwirkungsgesetz anzuwenden. ARRHENIUS prägte auch den Begriff "Immunochemie" [12][13].

Trotzdem dauerte es noch einige Jahrzehnte, bis von BERSON und YALOW [14]-[16] die ersten Immunoassays im heutigen Sinn realisiert wurden. Ende der 50er Jahre stellten sie fest, daß manche zuckerkrankte Patienten, die Schweine- oder Rinderinsulin zur Therapie injiziert bekommen hatten, einen verlangsamten Abbau des Hormons im Blut zeigten. BERSON et al. [17] postulierten damals die Existenz von insulinbindenden Antikörpern. Sie konnten mit radioaktiv markiertem Insulin diese Proteine nachweisen und quantifizieren. Der erste Radioimmunoassay (RIA) wird auf das Jahr 1959 datiert [18]. YALOW erhielt für diese Entdeckung 1977 den Nobelpreis für Medizin. Ein regelrechter Boom der immunologischen Verfahren wurde ausgelöst, dessen Ende bis heute noch nicht absehbar ist.

EKINS [19] hat fast gleichzeitig und unabhängig von BERSON und YALOW ein analoges System entdeckt, das auf den besonderen Eigenschaften des Thyroxin-bindenden Globulins (TBG) basierte. Es war speziell zur Messung des Schilddrüsenhormons Thyroxin (T4) geeignet. Als

---

<sup>2</sup> Karl Landsteiner hat u.a. die vier Blutgruppen A, B, AB und 0 entdeckt.

<sup>3</sup> Begriffsdefinitionen im GLOSSAR Kap. IX.

Tracer verwendete er ein mit dem Radioisotop  $^{131}\text{I}$  markiertes Thyroxin. Die Trennung der gebundenen von ungebundenen Tracer-Molekülen wurde durch Papierelektrophorese bewerkstelligt.

Die Schwierigkeit des Umgangs mit radioaktivem Material, sowie die Nachteile bei Herstellung und Lagerung der markierten Substanzen führten zu einer intensiven Suche nach "nicht-isotopischen" Markierungsverfahren. Einen erheblichen Fortschritt in dieser Richtung erbrachten die Arbeiten von NAKANE und PIERCE [20], sowie von AVRAMEAS [21] und anderen Arbeitsgruppen, die Enzyme für die Markierung in der Immunhistochemie einsetzten. Seit der Übertragung dieser Technik in den Bereich der löslichen Analyten (ENGVALL und PERLMANN [22][23], VAN WEEMEN und SCHUURS [24][25]) hat eine kontinuierliche Entwicklung der Enzymimmunoassays stattgefunden. Heute sind ELISAs die verbreitetste Methode unter den Immunoassays überhaupt.

Anfangs waren Immunoassays fast ausschließlich im Bereich der medizinischen Anwendung angesiedelt. Dies ist insofern leicht verständlich, da für viele medizinische Parameter (z.B. Viren, Proteine, Hormone) auch heute noch keine klassischen analytischen Verfahren existieren. Die moderne medizinische Analytik ist ohne immunologische Verfahren völlig undenkbar. Es dauerte verhältnismäßig lange, bis diese Tests ihren Weg zu anderen Bereichen, z.B. der Pestizidanalytik gefunden hatten. Nachdem im medizinischen Bereich schon mindestens die dritte Generation an Immunoassays entwickelt wurde, sind die Tests, die in der Umweltanalytik Anwendung finden, noch wenig verbreitet.

1975 sorgte die Herstellung der ersten monoklonalen Antikörper durch KÖHLER und MILSTEIN [26] für einen weiteren Innovationsschub. Man war nicht mehr auf die unproduzierbare Herstellung von Immunsereen angewiesen, die auch nach Aufreinigung eine komplexe Proteinmischung im allgemeinen unbekannter Zusammensetzung darstellt. Antikörper konnten nun als Reinsubstanzen in fast beliebiger Menge hergestellt werden. Begrenzend blieben in erster Linie die Kosten, da die Herstellung von monoklonalen Antikörpern ungleich aufwendiger ist als die Gewinnung von Antiseren.

Doch schon heute zeichnet sich die Ablösung dieses sog. Hybridoma-Verfahrens ab. Gentechnologische Methoden [27]-[29] ermöglichen es, die Information für die Herstellung von Antikörpern von Wirbeltierzellen auf z.B. *Escherichia coli* [30] zu übertragen. Es ergeben sich hierbei völlig neue Perspektiven bezüglich Design, Screening und Produktion von Antikörpern. Es läßt sich jetzt noch kaum abschätzen, welche Dimensionen diese Technik eröffnet.

Eine interessante Möglichkeit, Antikörper in technischem Maßstab zu erzeugen, basiert auf der Expression in Pflanzen [31][32]. Das Antikörper-Protein könnte aus den geernteten Pflanzen extrahiert und gereinigt werden. Auch diese Ansätze stecken jedoch noch in den ersten Anfängen.

## 2 Was ist ein Immunoassay?

Immunoassays [33]-[36] können als die wichtigste Gruppe der sog. Ligand-Bindungsassays angesehen werden, die auf der Fähigkeit eines Bindungsmoleküls basieren, ein Analytmolekül nicht-kovalent festzuhalten. Bei Immunoassays ist dieses Bindungsmolekül ein Antikörper [37] bzw. ein Teil eines Antikörpers. Immunoassays sollten nicht in erster Linie nach äußerlichen Kriterien, z.B. Testformat oder Art des Labels<sup>4</sup> eingeteilt werden. Die wichtigste Unterscheidung ist m.E. die Differenzierung zwischen kompetitiven und nicht-kompetitiven Tests [38][39], da sich beide Typen in ihrem Verhalten grundsätzlich unterscheiden. Bei kompetitiven Assays liegen die Antikörper im Unterschuß vor, Analyt und Tracer (bzw. Konjugat) konkurrieren um die begrenzte Anzahl Bindungsstellen. Im Bereich der Umweltanalytik wird ausschließlich dieser Testtyp eingesetzt. Dies wird durch die Größe des Analyten erzwungen. Nicht-kompetitive Tests brauchen mindestens zwei gleichzeitig zugängliche Bindungsstellen (Epitope) am Analyten. Dies ist jedoch bei kleinen Molekülen (z.B. Pestiziden) aus sterischen Gründen kaum realisierbar. VALENTINE und GREEN [40] haben elegante Experimente durchgeführt, um zu klären, wie groß ein Molekül mindestens sein muß, um mit zwei Antikörperbindungsstellen reagieren zu können. Sie verwendeten dazu bivalente Dinitrophenyl-Derivate. Ringförmige Komplexe aus mehreren Antikörpern bildeten sich erst ab einer Spacerlänge von 8 Kohlenstoffatomen, die Gesamtlänge dieses Moleküls betrug ca. 25 Å.

Nicht-kompetitive Immunoassays weisen erhebliche Vorteile bezüglich Sensitivität und Selektivität auf. So ist es durchaus denkbar, daß ein nicht-kompetitiver Immunoassay, die niedrigste überhaupt denkbare Nachweisgrenze eines Analyten erreichen kann: 1 Molekül [41].

Das Prinzip eines ELISAs ist in der Abb. 1 dargestellt. Schritt 1 entspricht der Beschichtung (Coating) der Mikrotiterplatte mit Analyt-bindenden Antikörpern<sup>5</sup>. Dies wird durch Adsorption der Antikörper an die Plattenoberfläche erreicht. Eine kovalente Anbindung ist normalerweise nicht notwendig. Nach dem Abwaschen der überschüssigen Antikörper mit einem speziellen Waschpuffer (tensidhaltig) wird die Probe zugegeben (Schritt 2). Das Volumen beträgt typischerweise 100-200 µL. Nach der Vorinkubationszeit wird zu der Probe noch eine konstante Menge eines Enzymtracers hinzugegeben. Dadurch wird eine Konkurrenzreaktion in Gang gesetzt, da nur eine begrenzte Zahl Antikörper anwesend sind. Nach der Tracerinkubationszeit werden Probe und überschüssige Reagenzien gewaschen. Gebunden bleibt insbesondere ein Teil des zugesetzten Enzymtracers (Schritt 3). Das gebundene Enzym kann

---

<sup>4</sup> Begriffsdefinitionen im Glossar Kap. IX.

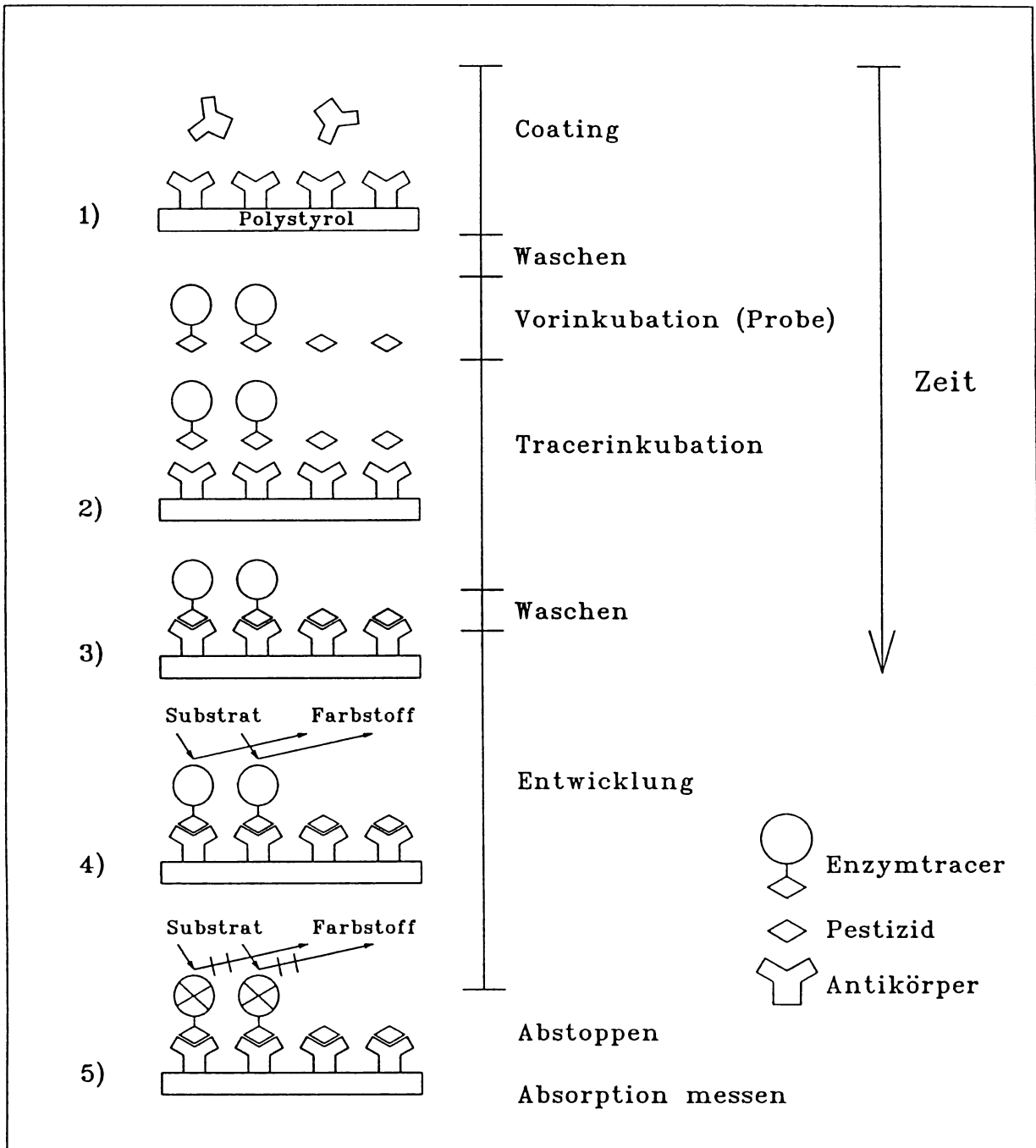
<sup>5</sup> Die Antikörper sind hier zur Vereinfachung monovalent gezeichnet. Dies entspricht nicht der Realität, da Antikörper der Klasse IgG zwei Bindungsstellen besitzen. Für den prinzipiellen Verlauf von Hapten-Immunoassays ist dieses Detail jedoch unerheblich.



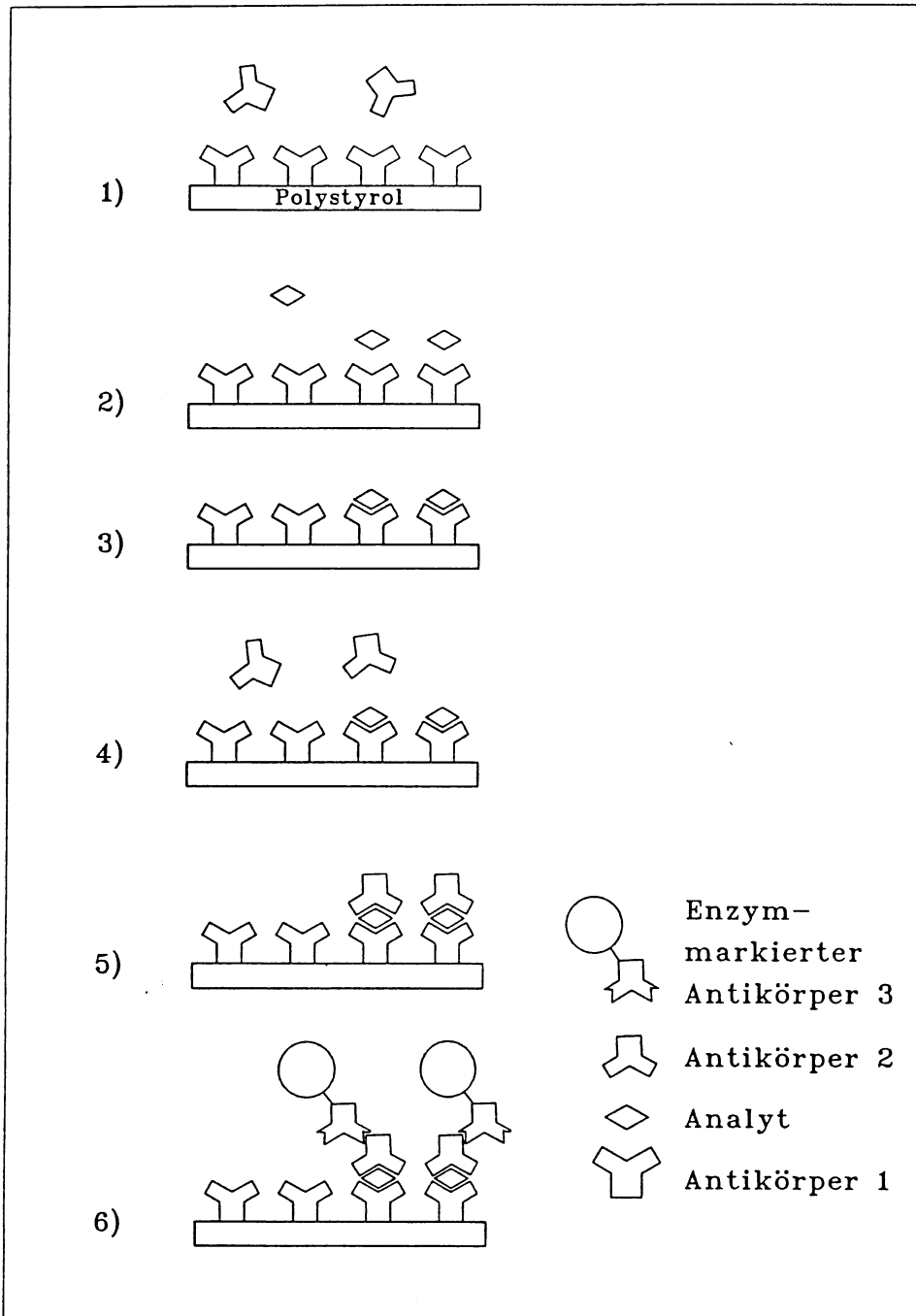
anschließend mit einem chromogenen Substrat leicht nachgewiesen werden (Schritt 4). Nach der Entwicklungszeit, die notwendig ist, um genügend Farbstoff zu erzeugen, wird das Enzym durch Zugabe von Säure denaturiert (Schritt 5). Anschließend können die Absorptionen in den einzelnen Kavitäten mit einem speziellen Photometer vermessen werden. Die Auswertung kann vollautomatisch mit einem angeschlossenen Personal-Computer erfolgen.

In dieser Arbeit soll auf nicht-kompetitive Verfahren (Abb. 2) nur kurz eingegangen werden, da bisher ausschließlich kompetitive Verfahren in der Pestizidanalytik eingesetzt wurden. Der wichtigste Unterschied zum kompetitiven Verfahren liegt in der notwendigen Größe des Analyten. Hier kommen insbesondere Polymere wie Proteine in Frage. Der in Schritt 1 auf die Mikrotiterplatte adsorbierte Fängerantikörper hat die Aufgabe, den Analyten aus der Probe zu extrahieren (Schritt 2) und festzuhalten. Nach einem Waschschrift (Schritt 3) gibt man einen zweiten Antikörper hinzu, der idealerweise eine andere antigene Determinante des Analyten erkennt (Schritt 4). Nach einem weiteren Waschschrift wird ein Enzym-markierter (anti-Antikörper)-Antikörper hinzugegeben, der an artfremde Antikörper bindet. Auf diese Weise wird die Menge des gebundenen Antikörpers 2 quantifiziert. Die zwischen einigen Schritten möglichen (und teilweise notwendigen) Blocking-Schritte zur Unterdrückung unspezifischer Bindung wurden in diesem Schema weggelassen. Es gibt jedoch auch Anhaltspunkte, daß unter günstigen Bedingungen ohne Blocking gearbeitet werden kann [42]. Bei nicht-kompetitiven Tests werden Eichkurven mit positiver Steigung erhalten. Dies führt dazu, daß diese Assays eine inhärent höhere Empfindlichkeit haben, die primär durch unspezifische Bindung und durch die Empfindlichkeit des Label-Nachweises limitiert wird. Für die Bindung zweier Antikörper ist jedoch eine Mindestgröße [40] des Analyt-Moleküls notwendig, das von den meisten umweltrelevanten Substanzen nicht erreicht werden dürfte.

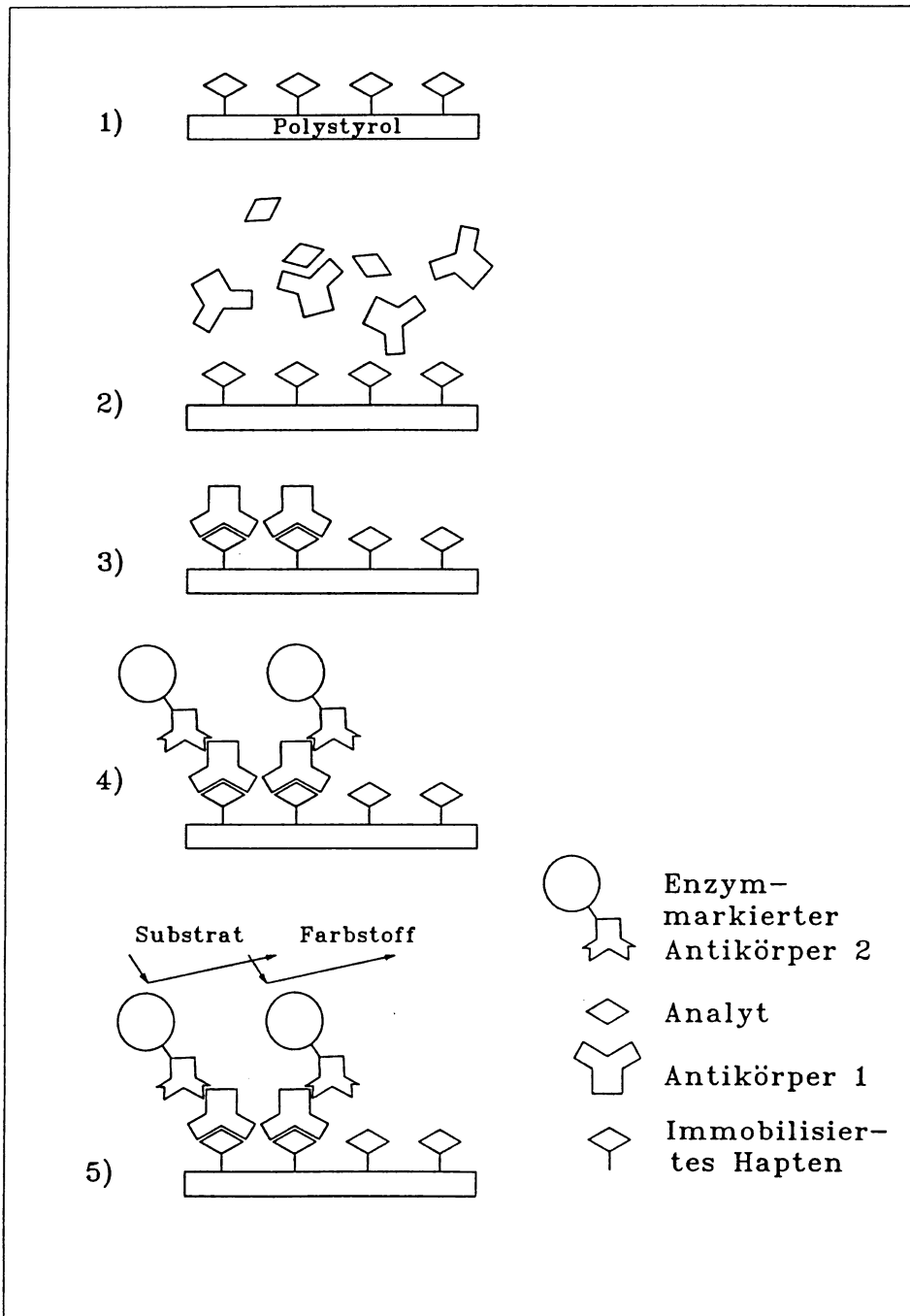
Die kompetitiven Verfahren können nunmehr in zwei weitere Gruppen aufgespalten werden: Die homogenen und die heterogenen Immunoassays. Homogene Immunoassays [43] laufen vollständig in Lösung ab und benötigen keine Waschschriffe. Durch sehr subtile Methoden (z.B. Fluoreszenzpolarisation [44] oder Enzyme-Channelling [45]) wird die Reaktion des Antikörpers mit dem Tracer direkt nachgewiesen. Homogene Immunoassays sind zwar einfach in der Anwendung und gut zu automatisieren, sie sind jedoch im allgemeinen stör anfälliger und unempfindlicher als heterogene Immunoassays, bei denen mindestens ein Reagenz an der Oberfläche eines Trägers immobilisiert ist und Waschschriffe zwingend erforderlich sind. Homogene Immunoassays sind wichtige Bestandteile von Schnelltests, die z.B. auf Teststreifen ablaufen.



**Abb. 1:** Prinzip eines kompetitiven Immunoassays (ELISA) mit photometrischer Detektion. Die Zeitachse soll die Bezeichnungen der unterschiedlichen Inkubationen erläutern. Die Zeitabschnitte können sehr stark variieren und sind nicht maßstäblich zu verstehen.



**Abb. 2: Prinzip eines nicht-kompetitiven Immunoassays.** Antikörper 1 ist ein sog. Fängerantikörper und bindet den Analyten. Antikörper 2 muß eine zweite (identische oder verschiedene) antigene Determinante binden können. Antikörper 3 bindet an artfremde Antikörper (der Art des Antikörpers 2) und ist kovalent mit einem Enzym verbunden.



**Abb. 3: Prinzip eines indirekten, kompetitiven Immunoassays.** Das immobilisierte Hapten entspricht einem Hapten-BSA-Konjugat, Antikörper 1 ist analytbindend, Antikörper 2 bindet an artfremde Antikörper und ist kovalent mit einem Enzym verbunden.

Heterogene Immunoassays können wiederum in normale und indirekte Testkonfigurationen aufgeteilt werden. Sie unterscheiden sich darin, daß im ersteren Fall der Antikörper auf dem Träger immobilisiert ist (siehe Abb. 1), im letzteren Fall ist ein Analyt-Konjugat immobilisiert. Die normale Konfiguration ist in der Regel der indirekten in puncto Sensitivität [46]-[48] und Schnelligkeit überlegen. Die indirekte Konfiguration hat den Vorteil der einfacheren Herstellung der Komponenten, sowie die Tatsache, daß Enzym und Probe keinen direkten Kontakt haben.

In Abb. 3 ist das indirekte Testformat für kompetitive Immunoassays dargestellt. Hier werden nicht die Antikörper, sondern die Analyt-Moleküle immobilisiert. Da kleine Moleküle nicht sehr fest an Polystyroloberflächen adsorbiert werden, verwendet man häufig Protein-Analyt-Konjugate, die in einem Coating-Schritt (nicht-kovalent) auf die Plattenoberfläche gebracht werden (Schritt 1). Nach einem Waschschrift wird die Probe zugegeben und der Analyt-bindende Antikörper zugesetzt (Schritt 2). Der Überschuß wird abgewaschen. Die gebundenen Analyt-Antikörper werden im Schritt 4 mit einem Enzym-markierten (anti-Antikörper)-Antikörper versetzt. Diese Antikörper binden z.B. an alle Antikörper (IgG) die von Kaninchen stammen. Nach einem weiteren Waschschrift wird Substrat zugegeben. Das Enzym wird durch Zugabe von Säure denaturiert und der Farbstoff photometrisch vermessen. Die bei diesem Testformat notwendigen Blocking-Schritte, die unspezifische Adsorptionen auf der Platte unterdrücken sollen, sind der Einfachheit halber weggelassen.

Außer den hier erwähnten Immunoassay-Typen gibt es noch unzählige weitere. Diese können jedoch oft als Varianten der o.g. Assays angesehen werden und werden hier nicht im Detail besprochen.

Interessant ist jedoch eine Analogie [49] zwischen Immunoassays und Isotopenverdünnungsmethoden. Bei der üblichen Isotopenverdünnungsmethode [50] wird eine bestimmte Menge an (meist radioaktiv) markiertem Analyten zur Probe hinzugefügt. Nach der Reinisolierung des Analyten (Wiederfindungsrate irrelevant) wird die Aktivität des isolierten Analyten mit der Aktivität des zugesetzten Analyten verglichen.

Anhand Gleichung 1

$$X = \left( \frac{A_m}{A} - 1 \right) X_m \quad (\text{Gl. 1})$$

mit	X	Menge des Analyten [g]
	$X_m$	Menge des markierten Analyten [g]
	A	spezifische Aktivität des isolierten Analyten
	$A_m$	spezifische Aktivität des markierten Analyten

läßt sich leicht die formale Analogie der Eichkurven zeigen.

Durch Umformen erhält man Gleichung 2:

$$\frac{X}{X_m} + 1 = \frac{A_m}{A} \quad (\text{Gl. 2})$$

Der Kehrwert lautet:

$$\frac{A}{A_m} = \frac{1}{1 + \left(\frac{X}{X_m}\right)} \quad (\text{Gl. 3})$$

Diese Gleichung ist formal identisch mit der sog. 4-parametrischen logistischen Kurve (siehe S. 23). Aus

$$Y = \frac{(A-D)}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B} + D \quad (\text{Gl. 4})$$

folgt mit  $D=0$  und  $B=1$  Gleichung 5:

$$Y = \frac{A}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)} \quad (\text{Gl. 5})$$

Normiert auf die maximale Absorption  $A$  erhält man

$$\frac{Y}{A} = \frac{B}{B_0} = \frac{1}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)} \quad (\text{Gl. 6})$$

wobei  $B$  hier nichts mit dem eingesetzten Steigungsparameter zu tun hat, sondern eine allgemein übliche Bezeichnung der Absorption der Probe ( $B$ ) bzw. der Absorption der Nullprobe ( $B_0$ ) ist.

Dies bedeutet, daß auch Eichkurven von Isotopenverdünnungsmethoden in halblogarithmischer Auftragung sigmoidal sein müssen. Folglich besitzen sie auch einen "Testmittelpunkt", der mit der zugesetzten Menge des markierten Analyten identisch ist. Bei einer Isotopenverdünnungsmethode können nicht wesentlich niedrigere Konzentrationen gemessen werden können, als die Konzentration des zugesetzten Isotops. Andernfalls unterscheidet sich die Aktivität des isolierten Analyten nicht mehr signifikant von der Aktivität des zugesetzten Analyten. Auch hier handelt es sich um eine Methode, die nicht konzentrationsproportionale Signale liefert. Es wird die Abnahme einer Aktivität relativ zu einer Standardaktivität gemessen.

Es soll aber nicht der Eindruck entstehen, Isotopenverdünnungsmethoden seien generell identisch mit Immunoassays. Dies kann man daran erkennen, daß die zugesetzte Menge des markierten Analyten theoretisch beliebig klein gemacht werden kann. Eine Limitierung tritt erst auf, wenn die Nachweisgrenze des markierten Analyten unterschritten wird. In der Praxis wird die Isolierung des Analyten viel früher versagen.

Ein kompetitiver Immunoassay ist jedoch oft affinitätslimitiert [51], d.h. ein beliebiges Verdünnen des Tracers ist wirkungslos.

Im Bereich der Isotopenverdünnungsmethoden existiert eine Parallele zu kompetitiven Immunoassays. Bei der Variante von RUZICKA und STARY [52] verwendet man sog. "substöchiometrische" Reagenzien. Das bedeutet, daß zur Probe (incl. Isotop) und zum radioaktiven Isotop allein, kleine, identische Mengen eines Reagenzes gegeben werden. So kann man jeweils gleiche Massen abscheiden. Es müssen dann keine Wägungen mehr durchgeführt werden. Dieser Analysen-Typ ist m.E. identisch mit einem kompetitiven Immunoassay, insbesondere einem RIA. Das substöchiometrische Reagenz entspricht dem Antikörper.

Bei der Isotopenverdünnungsmethode nach RUZICKA und STARY tritt gleichermaßen eine "Affinitätslimitierung" auf. Will man z.B. Sulfat mit Barium-Ionen fällen [53], so gelingt das nur, so lange das Löslichkeitsprodukt nicht unterschritten wird [54]. Für eine substöchiometrische Analyse darf maximal so viel Reagenz zugegeben werden, wie Analyt vorhanden ist. Mit  $10^{-5}$  mol/L Sulfat und  $10^{-5}$  mol/L Barium-Ionen wird diese Bedingung bei einem Löslichkeitsprodukt von  $10^{-10}$  gerade noch erreicht. Eine niedrigere Konzentration Sulfat läßt sich mit diesen Reagenzien ohne Anreicherung nicht messen, auch wenn die Nachweisgrenze des radioaktiv markierten Analyten noch weit entfernt ist. So ist bei einem Probenvolumen von 1 mL die löslichkeitslimitierte Nachweisgrenze bei  $10^{-8}$  mol, die Label-Nachweisgrenze liegt jedoch bei  $< 10^{-16}$  mol. Der Unterschied macht 8 Zehnerpotenzen Empfindlichkeit aus. Auch kleinere Verschiebungen des Löslichkeitsprodukts durch Abkühlung oder durch Lösungsmittelzusätze können an dieser prinzipiellen Situation nichts ändern. Wenn man z.B.  $10^{-10}$  mol/L Sulfat messen will, kann man auch mit einem empfindlicheren Label nichts ausrichten: Man optimiert an der falschen Stelle. Analoge Überlegungen gelten natürlich auch für Komplexbildungskonstanten.

### 3 Antikörper

Antikörper [55][56] sind globuläre Proteine, die im Serum von Wirbeltieren in der sog. Immunglobulin-Fraktion vorkommen. Antikörper werden von Plasmazellen (B-Zellen) hergestellt und sind ein entscheidender Faktor der Immunabwehr des Körpers. Jeder Mensch kann möglicherweise mehr als 10 Milliarden [57][58] verschiedene Antikörper herstellen. Interessanterweise ist diese Diversität nicht im Genom fixiert, sondern ist eine Folge eines Prinzips, das auf Zufallskombinationen einer begrenzten Anzahl von Genabschnitten beruht. Dieser Mischvorgang geschieht während der Embryonalphase und läßt sich auch bei

geklonten Individuen nicht reproduzieren. Die prä-B-Zellen warten nun auf den Kontakt mit dem zu ihrem Antikörper passenden Antigen. Erst nachdem ein entsprechendes Antigen von der prä-B-Zelle gebunden wurde, kann sich die Zelle zu einer Plasmazelle differenzieren, sich vermehren und die Antikörperproduktion beginnen. Diese Art der Antikörperinduktion wird Klon-Selektions-Theorie genannt. Sie wurde Ende der fünfziger Jahre von JERNE [59] und BURNET [60] vorgeschlagen. Obwohl viele Details z.B. des Antigenprocessings [61] und der Regulation unbekannt sind, gilt die Klon-Selektions-Theorie heute als völlig gesichert. Zusätzlich ist eine Phase der verstärkten Mutation [62] vorhanden, die eine Feinregulation der Antikörperaffinität ermöglicht. Antikörper können im allgemeinen nur gegen Stoffe mit einer Mindestgröße (Molmasse  $> 5000$ ) hergestellt werden, da das Immunsystem nur durch große Moleküle aktiviert wird [63]. Die meisten umweltrelevanten Chemikalien sind jedoch wesentlich kleiner und können daher nicht direkt als Immunogen verwendet werden. Stellt man dagegen Hapten/Carrier-Konjugate aus dem gewünschten Analyten und z.B. einem Protein her, so können Antikörper auch gegen kleine Moleküle erhalten werden.

Antikörper [64] der Klasse IgG besitzen eine Molmasse von ca. 150.000 und bestehen aus vier disulfidverbrückten Polypeptidketten, von denen je zwei identisch sind. Am N-terminalen Ende der Ketten sind die sog. hypervariablen Regionen lokalisiert, die in ihrer räumlichen Anordnung zwei identische Bindungsstellen bilden. Die Gesamtstruktur eines Antikörpers ähnelt ungefähr einem Y oder besser einem T. Die konstanten Regionen eines Antikörpers (einer Klasse) sind bei einem Individuum gleich, und können nach enzymatischer Abspaltung kristallisiert werden. Daher der Name  $F_c$ -Fragment (crystallizable). Der Rest des Antikörpers wird  $F_{ab}$ -Fragment genannt (antigen binding), wobei die variable Region  $F_v$ -Fragment genannt wird. Der  $F_c$ -Teil enthält Kohlenhydratreste, so daß Antikörper zu den Glycoproteinen gezählt werden.

Die Antikörperbindungsstelle ist bei Protein-Antigenen eine eher oberflächenorientierte Stelle am Antikörper, die möglichst genau komplementär zur Struktur des Antigens ist. Dagegen sind Hapten-Bindungsstellen mehr Taschen oder Spalten, die das Hapten aufnehmen können. Die Wechselwirkungen, die eine Hapten-Antikörper-Bindung hervorrufen, können sehr unterschiedlich sein. Oft wird angenommen, daß hydrophobe Wechselwirkungen [65] (d.h. entropiegetriebener Wasserausschluß [66]) den größten Anteil ausmachen. Möglicherweise gilt dies aber nur für hydrophobe Haptene. Da bisher nur wenige Hapten-Antikörper-Komplexe einer Röntgenstrukturanalyse bei hoher Auflösung unterworfen wurden, können nur begrenzte Aussagen über die Art der Bindung in einer Antikörperbindungsstelle gemacht werden [67]. Die Kristallisation von Proteinen ist ein kritischer Schritt in der Untersuchung von Proteinen mittels Röntgenstrukturanalyse, daher werden verstärkt auch Verfahren in Lösung wie NMR [68] für die Untersuchung von Antikörperbindungsstellen benutzt.



Angaben über die Größe einer Haptenbindungsstelle variieren naturgemäß beträchtlich, es gibt Angaben wie  $8 \times 8 \times 3 \text{ \AA}$  [69], 6 Zuckerreste, 4 Aminosäuren,  $12 \times 15 \times 20 \text{ \AA}$  [70],  $20 \times 25 \text{ \AA}$  bzw.  $15 \times 6 \times 6 \text{ \AA}$ , [71]. Trotzdem ist es hierdurch möglich, die Größenordnung der Dimensionen einer Antikörperbindungsstelle abzuschätzen. Für Immunoassays ist normalerweise kein vollständiger Antikörper notwendig. Es reicht die kleinste Einheit, die noch eine funktionelle Bindungsstelle repräsentiert. Dies ist nach dem jetzigen Stand der Erkenntnisse ein  $F_v$ -Fragment [72], wobei die beiden Kettenteile auch zu einer einzigen Polypeptidkette verbunden sein können.

Für heterogene Immunoassays sollte sich der Antikörper an eine Oberfläche immobilisieren lassen, wobei die Details dieses Adsorptionsprozesses [73] nur unzureichend bekannt sind. Über die Stabilität [74] von Antikörpern gibt es widersprüchliche Angaben. Vermutlich ist die Struktur des einzelnen Antikörpers direkt ursächlich verantwortlich für dessen Stabilität. Es gibt einige Untersuchungen, z.B. durch Vernetzung, Immobilisierung oder zusätzliche Disulfidbrücken die Antikörperstabilität zu verbessern. Es fehlt jedoch weitgehend eine allgemeine Strategie.

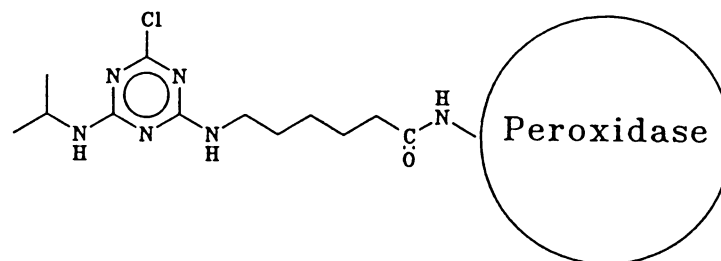
Die Struktur der Bindungsstelle zur Bindung eines vorgegebenen Analyten ist bisher weitgehend dem Zufall überlassen. Polyklonale Antikörper sind zum heutigen Zeitpunkt eindeutig erfolgreicher als monoklonale Antikörper, was die Herstellung hochempfindlicher Pestizid-immunoassays angeht. Dies hängt vermutlich damit zusammen, daß man bei polyklonalen Antikörpern das gesamte Spektrum der produzierten Antikörper verwendet. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist in dieser Mischung eine kleine Fraktion exzellenter Antikörper enthalten, die den Test dominieren. Bei monoklonalen Antikörpern muß man den seltenen Fall realisieren, daß man genau die Zelle, die den besten Antikörper produziert, isolieren kann. Dies ist nur bei der Verwendung extrem effektiver Screeningmethoden, sowie der Untersuchung einer sehr großen Anzahl an Hybridomazellen zu erwarten. Bei ungünstigeren Voraussetzungen (z.B. bei finanziellen, personellen oder zeitlichen Engpässen bzw. bei der Verwendung einer ungeeigneten Screening-Methode) werden sehr oft nur mittelmäßige Antikörper gefunden.

Bei der Verwendung von gentechnologischen Verfahren [75], die sich jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch in einem frühen Experimentalstadium befinden, kann durch Protein-engineering erstmals Einfluß auf die detaillierte Struktur des Antikörpers genommen werden. Gezielte Manipulationen zur Veränderung der Bindungsstelle oder die Einführung von Sekundärfunktionen erscheinen nun möglich. Besonders in Kombination mit Methoden des "Molecular Modelling" sind hier erhebliche Fortschritte zu erwarten [76]. Vielleicht könnten Antikörper von nicht gehörter Spezifität und Affinität hergestellt werden, die den Anwendungsbereich von Immunoassays nochmals erheblich erweitern würden.

Die Erkenntnisse auf dem Gebiet des Antikörperdesigns wachsen sehr schnell. Nicht nur aus molekularbiologischer, proteinchemischer, immunologischer oder medizinischer Richtung sind Neuerungen zu erwarten. Einen Antikörperkomplex kann man auch als einen Spezialfall eines host-guest-Komplexes ansehen. Die Fortschritte auf dem Gebiet der supramolekularen Chemie [77] werden sich daher auch auf dem Gebiet der Immunoassays auswirken, wobei im Moment nicht klar ist, welche Richtung sich schneller entwickeln wird.

#### 4 Enzymtracer

Ein Enzymtracer ist ein Konjugat aus einem (modifizierten) Analyt-Molekül und einem leicht nachweisbaren Enzym. Tracer können durch eine Konkurrenzreaktion indirekt Antikörper/Antigen-Reaktionen meßbar machen.



**Abb. 4: Enzymtracer (nicht maßstäblich).** An eine Aminogruppe des Markerenzym Meerrettichperoxidase wurde eine Carbonsäure gekoppelt. Der dargestellte Tracer eignet sich zum Nachweis von Atrazin.

Viele Enzyme sind als Enzymlabel [78] erprobt worden. Da an ein Enzymlabel hohe Ansprüche gestellt werden, die meist nur partiell erfüllt werden können, haben sich nur wenige Enzyme in der Praxis durchgesetzt. Am häufigsten wird wahrscheinlich die Meerrettichperoxidase (POD, HRP) eingesetzt. Eine gewisse Bedeutung haben auch Alkalische Phosphatase und  $\beta$ -Galactosidase erlangt. Meerrettichperoxidase hat einige wichtige Vorteile: Sie ist sehr empfindlich nachzuweisen und preisgünstig in hoher Reinheit erhältlich. POD läßt sich mit unterschiedlichen Methoden koppeln und ist robust gegenüber vielen denaturierenden Einflüssen. Zudem gibt es eine große Auswahl an chromogenen [79]-[82], fluorogenen [83] und luminogenen [84] Substraten.

Ein nicht zu unterschätzender Vorteil ist die Tatsache, daß von den 6 Lysinresten nur 1 bis 3 tatsächlich von außen zugänglich sind. Dies führt zu einer reproduzierbaren Kopplung mit einer niedrigen Kopplungsdichte. Als Nachteil muß angemerkt werden, daß die HRP durch ihr Substrat  $H_2O_2$  gehemmt wird und daher während der Farbreaktion schnell an Aktivität verliert. Langzeitmessungen lassen sich daher mit POD bisher nicht durchführen. Auch ist die räumliche Struktur der Meerrettichperoxidase nur ungefähr bekannt, eine Röntgenstrukturanalyse fehlt bis heute. Das kommerziell erhältliche Enzym kann aus verschiedenen

Isoenzymen [85] bestehen, die erhebliche Unterschiede in ihren Eigenschaften aufweisen; manche Präparationen enthalten jedoch ca. 90% des basischen Isoenzym C.

**Tabelle 1: Daten zur Meerrettich-Peroxidase [86]-[90]<sup>1</sup>**

Molmasse	40.000-44.000
Prosthetische Gruppe	Protohämatin IX (Häm)
Aminosäuren [91][92]	308 (monomer)
Kohlenhydrat-Anteil [93]	17-21 % (8 Ketten)
Calcium [94][95]	2
Lysin	6
Lysin (derivatisierbar) [96]-[99]	1-3
Disulfid-Brücken	4
Cystein (frei)	0
Histidin, Tyrosin, Tryptophan	3, 5, 1
Aminoterminus	Pyroglutamyl-Rest (blockiert)
Carboxylterminus	Serin (labil)
Absorptionsmaxima	403 nm, 275 nm
Stokes Radius	3 nm
Isoelektrischer Punkt	pH 8.7-9.0 (Isoenzym C)
Absorptionskoeffizient (403 nm, 1 %, 1 cm)	22.5
Absorptionskoeffizient (403 nm, molar)	$1.02 \cdot 10^5$
Reinheitzzahl (RZ)	3.33 (Isoenzym C 1)
Chromogene Substrate (Bsp.)	TMB, ABTS, OPD
Fluorogene Substrate (Bsp.)	Homovanillinsäure, HPA, HPPA
Luminogenes Substrat (Bsp.)	Luminol
Inhibitoren [83]	$N_3^-$ , $H_2O_2$ , $Mn^{2+}$ , $S^{2-}$ , $Co^{2+}$ , $CN^-$ , $F^-$

1

Die angegebenen Literaturzitate beziehen sich sinngemäß auf das Stichwort und nicht unbedingt auf den angegebenen Wert.

## 5 Label

Nicht nur Enzymtracer können für Immunoassays verwendet werden. Es ist eigentlich jede nachweisstarke Einheit prinzipiell geeignet. Eine mögliche Unterscheidung von Immunoassays kann durch die Art der Markierung (Label) vorgenommen werden [100]. Besonders hervorzuheben sind Methoden, die völlig ohne markierte Analyten auskommen. Hierzu gehören z.B. Surface-Plasmon-Resonance (SPR [101]) oder Evanescent Wave-Methoden (ATR, TIRF [102]), die direkt die Wechselwirkung zwischen Analyt und Antikörper verfolgen. Diese Techniken, die z.B. auf der Absorption von Licht (ATR), auf der Anregung von Fluoreszenz oder der Veränderung des Brechungsindex an einer Grenzfläche (SPR) beruhen, haben jedoch bisher einen entscheidenden Nachteil: Bei kleinen Molekülen (dies kann schon  $M_r < 100.000$  bedeuten) ist das Signal nicht meßbar. Daher sind diese Verfahren (ohne Label) nur für die Analytik von z.B. Proteinen im Spurenbereich nutzbar.

Das älteste Verfahren ist die radioaktive Markierung. Benutzt werden insbesondere die Isotope  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  (Tritium) und  $^{14}\text{C}$  [103], wobei sich  $^{125}\text{I}$  durch eine besonders hohe Nachweisempfindlichkeit auszeichnet. Tritium und  $^{14}\text{C}$  haben den Vorteil, daß chemisch unveränderte Analyten angewandt werden können ("internes Label"). Wenn man einen geringfügigen Isotopeneffekt vernachlässigt, so ist keine Diskriminierung zwischen Analyt und Tracer zu erwarten.

Trotz der inhärent hohen Sensitivität der Messung radioaktiver Strahlung, sind Radioisotope keine idealen Label. Abgesehen von gesundheitlichen Konsequenzen des (evtl. unsachgemäßen) Umgangs mit radioaktivem Material gibt es noch weitere Limitierungen: Die spezifische Radioaktivität darf einen bestimmten Wert nicht wesentlich überschreiten, da sonst Radiolyse zu einer raschen Zerstörung des Tracers führt. Auch kann jedes Label nur ein einziges Mal zerfallen. Der Zerfall beginnt schon bei der Herstellung des Radioisotops, nicht erst bei der Messung. Es ist also im Endeffekt nur ein winziger Teil der potentiell im Tracer steckenden Energie nutzbar, der Rest verursacht Probleme bei der Lagerung, Handhabung und nicht zuletzt der Entsorgung. Auch die strengen Auflagen beim Umgang mit radioaktivem Material erschweren die Anwendung von RIAs erheblich.

Schon seit vielen Jahren werden Enzyme als Label verwendet. Der Erfolg von enzymatischen Systemen läßt sich auf mehrere Faktoren zurückführen: Enzyme sind extrem empfindliche Marker, die auch klassische fluorimetrische und luminometrische Methoden oft weit übertreffen. Enzymaktivitäten können z.B. mit Photometern, Fluorimetern oder Luminometern bestimmt werden, wobei i.A. die Empfindlichkeit in dieser Reihenfolge zunimmt. Trotzdem sollte man die Vorteile von chromogenen Substraten nicht unterschätzen: Der technische Aufwand für die Messung kann sehr niedrig gehalten werden, im Grenzfall kann eine rein visuelle Auswertung vorgenommen werden (halbquantitativ). Zudem ist bei chromogenen Substraten der Vorgang der Farbentwicklung gut sichtbar und jederzeit unter Kontrolle.

Tabelle 2: Vergleich verschiedener Marker.

Label (bzw. Substanz)	NG [mol/L]	NG [mol]	Methode (bzw. Prinzip)
Tritium ( $^3\text{H}$ ) [104]	-	ca. $5 \cdot 10^{-16}$ *	Flüssig-Szintillation ( $\beta^-$ , 20 KeV)
Kohlenstoff ( $^{14}\text{C}$ )	-	ca. $4 \cdot 10^{-13}$ *	Flüssig-Szintillation ( $\beta^-$ , 200 KeV)
Iod ( $^{125}\text{I}$ ) [105]	ca. $1 \cdot 10^{-14}$	ca. $1 \cdot 10^{-17}$ *	$\gamma$ -Counter ( $\gamma$ , 27 u. 35 KeV)
Schwefel ( $^{35}\text{S}$ )	-	ca. $2 \cdot 10^{-17}$ *	Flüssig-Szintillation ( $\beta^-$ , 190 KeV)
POD (TMB) [35]	$2 \cdot 10^{-15}$	ca. $1 \cdot 10^{-18}$	Enzym/Photometrie
POD (HPPA) [35]	$5 \cdot 10^{-14}$	-	Enzym/Fluorimetrie
POD (HPA) [35]	$1 \cdot 10^{-15}$	-	Enzym/Fluorimetrie
$\beta$ -Gal (MUG) [35]	$5 \cdot 10^{-16}$	-	Enzym/Fluorimetrie
POD (HPA) [78]	$7.5 \cdot 10^{-14}$	-	Enzym/Fluorimetrie
AP (MUP) [78]	$1.8 \cdot 10^{-15}$	-	Enzym/Fluorimetrie
AP (MUP) [106]	-	$5 \cdot 10^{-19}$	Enzym/Fluorimetrie
ACH (Acetylthiocholin) [107]	$8 \cdot 10^{-15}$	$1.6 \cdot 10^{-18}$	Enzym/Photometrie
AP (NPP) [107]	$7.5 \cdot 10^{-14}$	$1.5 \cdot 10^{-17}$	Enzym/Photometrie
POD (o-Phenylendiamin) [107]	$1.8 \cdot 10^{-14}$	$3.6 \cdot 10^{-18}$	Enzym/Photometrie
AP (AMPPD) [108]	ca. $2 \cdot 10^{-17}$	$1.6 \cdot 10^{-21}$	Enzym/Chemilumineszenz
AP (D-Luciferin-o-phosphat) [109]	-	$5 \cdot 10^{-20}$	Enzym/Chemilumineszenz
POD (Luminol) [109]	-	$5 \cdot 10^{-17}$	Enzym/Chemilumineszenz
AP (NADP) [110]	-	$1.1 \cdot 10^{-20}$	Enzymkaskade/Photometrie
$\beta$ -Galactosidase (NAD) [111]	-	$2 \cdot 10^{-22}$	Enzymkaskade/Biolumineszenz
$\beta$ -Galactosidase (NAD) [112]	-	$3.3 \cdot 10^{-21}$	Enzymkaskade/Chemilumineszenz
Pyren [113]	$7.4 \cdot 10^{-7}$	-	Fluorimetrie
Pyren [113]	$2.5 \cdot 10^{-9}$	-	Laser-induzierte Fluoreszenz
Kokain [113]	$3.3 \cdot 10^{-10}$	-	Fluorimetrie
Chinin [113]	$6.2 \cdot 10^{-9}$	-	Fluorimetrie
Fluorescein [109]	-	$2 \cdot 10^{-14}$	Fluorimetrie
Rhodamin [109]	-	$5 \cdot 10^{-15}$	Fluorimetrie
Fluorescein [114]	$5.0 \cdot 10^{-15}$	-	Laser-induzierte Fluoreszenz
Rhodamin B [114]	$1 \cdot 10^{-12}$	-	Laser-induzierte Fluoreszenz
Eu- $\beta$ -Diketonat [114]	$2 \cdot 10^{-15}$	-	Laser-induzierte Fluoreszenz

\*  $^{125}\text{I}$  und  $^{35}\text{S}$  abgeschätzt aus Halbwertszeit mit NG=1 count/s und 80% Detektor-Effizienz.  
 $^{14}\text{C}$  und  $^3\text{H}$  aus [103] relativ zu  $^{125}\text{I}$ .  
- Keine Angaben verfügbar.

In Tabelle 2 sind die Nachweisgrenzen für die Detektion verschiedener Label (bzw. potentieller Label) gegenübergestellt. Es besteht weitgehender Konsens, daß konventionelle Fluoreszenzlabel für Immunoassays meist nicht empfindlich genug detektiert werden können [115]<sup>6</sup>. Laser-induzierte Fluoreszenz kommt in bestimmten Fällen in die Nähe der Nachweisgrenze von photometrisch detektierten Enzymen. Besonders empfindlich ist die zeit aufgelöste Messung von Lanthanoid-Chelaten. Die Enzym-Bestimmung mittels Chemilumineszenz erscheint jedoch von keiner anderen Methode in ihrer Sensitivität auch nur annähernd erreichbar zu sein. Radioaktive Isotop-Label sind meist unempfindlicher als Enzyme [116]: Dies ist vermutlich auch ein Grund, weshalb RIAs stark zurückgehen [117]. Marker, die schlechtere Nachweisgrenzen als die häufig verwendete Meerrettich-Peroxidase haben, dürften nur für Spezialanwendungen interessant sein.

Viele Label-Enzyme sind stabiler als bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe [118] oder Radioisotope und können lange Zeit ohne nennenswerten Aktivitätsverlust aufbewahrt werden [119][120]. Es wurde die Anwendung vieler anderer Marker in Immunoassays versucht, die jedoch kaum Bedeutung erlangt haben.

Es muß betont werden, daß die Anwendung verschiedener Label in erster Näherung keinen Einfluß auf das Ergebnis eines (kompetitiven) Immunoassays hat. Das Label hat die Aufgabe, den Vorgang der Antikörper-Bindung sichtbar bzw. meßbar zu machen. In welcher Form dies geschieht, ist von zweitrangiger Bedeutung. Daher wird man sich häufig für die Verwendung eines möglichst bequemen und zuverlässigen Labels entscheiden. Andererseits ist die Verwendung eines nicht ausreichend empfindlichen Labels meist nicht adäquat. Der Atrazin-Antikörper S84 wurde in einem Fluoreszenz-Immunoassay (FITC-gelabelte Antikörper) eingesetzt [121]. Der Vergleich zwischen Immunoassays auf der Grundlage von Peroxidase- (siehe S. 182) bzw. FITC-markierten Komponenten zeigt eine ca. 1000fach niedrigere Nachweisgrenze für den Peroxidase-Test (3 bzw.  $3 \cdot 10^{-3}$  µg/L Atrazin).

## 6 Trägermaterialien

Heterogene Immunoassays benötigen zwingend eine zweite Phase, die die Abtrennung der gebundenen und nicht gebundenen Komponenten ermöglicht. In der Regel handelt es sich hier um die Oberfläche eines Polymers. Am weitest häufigsten werden sogenannte Mikrotitrationsplatten aus Polystyrol verwendet [100]. Sie besitzen 96 Kavitäten und sind mit unterschiedlich behandelten Oberflächen erhältlich. Die breiteste Anwendung erfahren Mikrotitrationsplatten mit "high-capacity"-Charakteristik, was sich auf die hohe Bindungskapazität für Proteine bezieht. Die hohe Bindungskapazität wird angeblich durch eine Oberflächenbehandlung im Plasma erreicht. Problematisch sind die bisher unvermeidlichen Schwankungen der Bindungskapazität von  $\pm 5$  %, die das Ergebnis eines Immunoassays stark beeinflussen

---

<sup>6</sup> "However, conventional fluorescence immunoassay has not been widely applied because of its lack of sensitivity."

können. Diese Materialunterschiede sind vermutlich die Ursache für die nicht mehr signifikant verbesserungsfähige Reproduzierbarkeit.

Um das "Ausbluten" von Reagenzien während der Waschschriffe zu verhindern, werden auch verschiedene Platten mit kovalenten Bindungsmöglichkeiten [122] angeboten. Die über Carboxylgruppen, Aminogruppen oder Epoxide koppelbaren modifizierten Polystyroloberflächen zeigen oft ähnliche Ergebnisse im Vergleich mit adsorptiv bindenden Platten. Kovalent koppelbare Platten dürften nur dann erhebliche Vorteile aufweisen, wenn adsorptive Verfahren nicht anwendbar sind.

Neben Mikrotitrationsplatten sind auch Polystyrolröhrchen und -kugeln im Gebrauch. Auch Gelsäulen und Magnetpartikel werden als Trägermaterial eingesetzt. Dennoch sind alle neuen Trägermaterialien und Formate bisher den Beweis schuldig geblieben, signifikante Vorteile gegenüber der Standard-Polystyrolplatte zu bieten. Im Gegenteil, die Anwendung erscheint fast immer komplizierter und die Materialien sind unverhältnismäßig teuer. Eine interessante Neuentwicklung soll jedoch trotzdem nicht verschwiegen werden: Für Spezialanwendungen kann sich eine Standard-Mikrotiterplatte aus Quarzglas [123] als hilfreich erweisen. Probleme mit Störfluoreszenz und Adsorption von Analyten oder Testkomponenten werden vermindert.

## 7 Puffer und Enzysubstrate

Im Körper befinden sich Antikörper (IgG) gelöst in der Serumflüssigkeit. Diese enthält neben Kochsalz, Proteinen und Aminosäuren viele andere Substanzen. Ausgehend von der Annahme, daß Antikörper im Originalmedium optimale Eigenschaften zeigen (keine Denaturierung bzw. Deformation) sollten auch die Reagenzien in Immunoassays diesem Medium möglichst nahe kommen. Zumindest pH-Wert und Ionenstärke sollten sich normalerweise nicht stark von Blut unterscheiden. Dieser Forderung entspricht PBS-Puffer (phosphate buffered saline) mit einem pH von 7,6 schon weitgehend. Nach Waschschriffen ist die leere Kavität jedoch von unkontrollierter Austrocknung bedroht. Daher ist der Zusatz von Tensiden wie Tween 20 für Waschflüssigkeiten notwendig. Sie bilden eine wasserhaltige "Schutzschicht" über den Antikörpern. Zudem lösen Tenside weitgehend alle locker (d.h. in der Regel unspezifisch gebundenen) Reagenzien von der Wand ab. Dies senkt den unspezifischen Untergrund des Signals erheblich und relativiert Probleme mit einem "Bluten" der immobilisierten Reagenzien.

Die Konzentration des Chromogens erscheint relativ unkritisch und wird hauptsächlich durch dessen Löslichkeit limitiert. Dagegen erfordert die Einstellung der "richtigen" Wasserstoffperoxidkonzentration eine sorgfältige Abwägung.  $H_2O_2$  ist nicht nur Substrat, sondern auch ein starker (irreversibler) Inhibitor der Meerrettichperoxidase. Die mit  $H_2O_2$  gebildete Oxyperoxidase (compound III) ist enzymatisch inaktiv [88]. Die Geschwindigkeit der Produktion von compound III wird in erster Linie von der Wasserstoffperoxidkonzentration be-

stimmt. Das bedeutet, daß höhere  $H_2O_2$ -Konzentrationen zwar eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit der Farbstoffproduktion bedeutet, daß aber die Desaktivierung der Peroxidase auch schneller voranschreitet. Vergleicht man Messungen der Peroxidaseaktivität unter verschiedenen Bedingungen, so ist unbedingt darauf zu achten, daß identische Reaktionszeiten angewandt werden, auch identisch im Bezug auf die im Test gewünschte Entwicklungszeit. Das Optimum der Wasserstoffperoxidkonzentration gilt also nur für diese bestimmte Reaktionszeit. Durch "kinetische" Messung während der Entwicklungszeit kann die zunehmende Desaktivierung der Peroxidase gut verfolgt werden. Eine weitere Verlängerung der Entwicklungszeit nach der Desaktivierung der POD ist nicht sinnvoll, da nur noch der unspezifische Anteil der Farbstoffbildung zunimmt.

Tetramethylbenzidin ist ein relativ neues Substrat für die Bestimmung von Peroxidase. Es wurde gezielt aus toxikologischen Erwägungen synthetisiert, um ein nichtkanzerogenes Benzidinderivat zu erhalten. Die vollständige ortho-Methylierung scheint offensichtlich zur toxikologischen "Entschärfung" geführt zu haben. Bisher sind keine bedenklichen Befunde bekannt geworden [124]. So ist TMB im Ames-Test im Gegensatz zu allen anderen üblichen Benzidinderivaten negativ [125]. Die enzymkatalysierte Oxidation von TMB liefert einen blauen Charge-Transfer-Komplex, der aus TMB und dem korrespondierenden Diimin besteht [126]. Dieser Komplex steht im Gleichgewicht mit dem Radikalkation. Überschuß an  $H_2O_2$  liefert das gelbe Diimin, das auch bei Zugabe von Säure aus dem Charge-Transfer-Komplex freigesetzt wird. Diese Reaktion wird beim Abstoppen der "Entwicklung" im ELISA ausgenutzt, da das Diimin einen höheren Absorptionskoeffizient besitzt als der Komplex.

Obwohl die Aktivität von Peroxidase oft in "Units" [U/mg] angegeben wird, die sich auf das Substrat ABTS beziehen, sollte daraus nicht der Schluß gezogen werden, daß dies das "beste" Substrat für Meerrettichperoxidase darstellen würde. Abgesehen von diversen Nachteilen im Umgang mit dem ABTS-System kann festgestellt werden, daß TMB höhere Signale ergibt als andere getestete Substrate. Es zeigt sich auch im kommerziellen Bereich, daß sich aus den genannten Gründen TMB immer stärker durchsetzt. TMB wird in Puffern (Citrat, Acetat, Phosphat) eingesetzt, die einen relativ niedrigen pH-Wert (3.7 bis 6) haben. Dies entspricht dem pH-Optimum der Meerrettichperoxidase und kommt auch der Löslichkeit des TMBs entgegen. Problematisch erscheint aber die beschleunigte Denaturierung der Peroxidase in sauren Puffern. Daher muß ein Kompromiß zwischen Enzymaktivität und Enzymstabilität gesucht werden.

Das Beschichten (Coaten) der Mikrotiterplatten mit Antikörpern (bzw. Antigen) wird in der Regel in einem basischen Puffer (Carbonat, pH 9.6) durchgeführt. Dies führt zu einer zuverlässigen Adsorption, auch bei niedrigen Coating-Konzentrationen. Diese Methode hat aber ihre Schwächen: So führt sowohl der hohe pH-Wert als auch die Adsorption an der Mikrotiterplatte zu einer starken Minderung der Anzahl der funktionellen Bindungsstellen, was summarisch als Denaturierung beschrieben werden könnte. Eine Vorbeschichtung mit anti-Maus-IgG- (bzw. anti-Kaninchen-IgG-) Antikörpern ist bei empfindlichen Antikörpern



vorteilhaft. Hier wird sowohl der basische Coating-Puffer, als auch die direkte Adsorption an der Kunststoffoberfläche vermieden.

## 8 Messung und Auswertung

In ELISAs (siehe Abb. 1), die auf chromogenen Substraten basieren, kann der Verlauf der Farbstoffentwicklung sehr einfach visuell verfolgt werden. Es sind kaum Optimierungsschritte erforderlich, da die Entwicklungszeit flexibel an die schon vorhandene Farbstoffmenge angepaßt werden kann. Im Prinzip wird im ELISA eine immunologische Reaktion auf eine Aktivitätsbestimmung eines Enzyms zurückgeführt. Diese kann auf zwei prinzipiell unterschiedliche Weisen durchgeführt werden: 1. Eine Endpunktbestimmung und 2. eine kinetische Messung. Bei der Endpunktbestimmung wird nur ein Meßpunkt ermittelt, der durch photometrische Messung am Ende einer längeren Entwicklungszeit erhalten wird. Ob vorher die enzymatische Reaktion durch ein spezielles Reagenz (z.B. Schwefelsäure) abgestoppt wird oder nicht, ist hierbei nicht entscheidend.

Bei einer kinetischen Messung einer Enzymaktivität wird sofort nach Zugabe der Substratlösung in regelmäßigen Abständen die Absorption der Lösung ermittelt. Durch lineare Regression eines Teils der Absorptions/Zeit-Kurve erhält man für jede Kavität eine Steigung, die proportional der Enzymaktivität bzw. -menge ist.

In der Praxis hat sich gezeigt, daß die Messung der Absorption nicht fehlerbestimmend und daher unkritisch ist. Die möglicherweise höhere Präzision der kinetischen Messung schlägt sich daher nicht auf die Präzision des Endergebnisses nieder. Es sind eher praktische Gründe die für oder gegen eine bestimmte Methode sprechen: Bei Tetramethylbenzidin als Substrat hat der abgestoppte Farbstoff (gelb) einen höheren Absorptionskoeffizienten als der primär produzierte (blau), daher ist in diesem Fall eine Endpunktsbestimmung angebracht. Auch die wesentlich geringeren Rohdatenmengen, die einfachere Datenverarbeitung, übersichtlichere Datendarstellung und die kurze Meßzeit, die bei Geräteengpässen auch zeitlich aufgeschoben werden kann, sprechen für die Endpunkt-Methode mit Abstoppen. Dagegen sind mit der kinetischen Messung unter bestimmten Bedingungen aussagekräftigere Meßwerte zu erwarten. So kann der zeitliche Verlauf der Absorption genau verfolgt werden, die Auswertung kann sich auf den linearen Teil der Kinetik beschränken und daher Verzerrungen durch partiell nichtlineare Enzymkinetiken vermeiden helfen. Es kann auch noch nachträglich die optimale Auswertung gesucht werden. Dagegen muß man sich bei der Endpunktsbestimmung auf einen (irreversiblen) Zeitpunkt des Abstoppens festlegen, der oft nur einen Kompromiß darstellt.

Ein Vorteil der Methoden ohne Abstoppen ist der Wegfall eines Pipettierschritts. Grob könnte man die Gewichtung so vornehmen, daß Routinemessungen am besten mit der Endpunktmethode durchgeführt werden sollten. Messungen, bei denen hohe Ansprüche an die Auswertung der Daten gestellt werden und bei denen entsprechende Gerätekapazität (Photometer und Rechner) vorhanden ist, sollten mit der anspruchsvolleren kinetischen Methode durch-

geführt werden. Sie liefert auch zusätzliche Informationen über den Verlauf der enzymatischen Reaktion. Dies kann zu zusätzlicher Diagnostik über den störungsfreien Verlauf eines ELISAs herangezogen werden, was die Sicherheit eines immunologisch erhaltenen Ergebnisses noch weiter erhöhen kann.

Für die quantitative Auswertung von ELISA-Daten [127] reicht es nicht aus, nur einzelne Absorptionsdaten zu vergleichen. In diesen Fällen muß eine Eichkurve (Kalibration) erstellt werden. Die Aufteilung einer Mikrotiterplatte in Eichwerte und Proben sollte nach statistischen Gesichtspunkten erfolgen [128].

ELISAs zeigen eine für viele Anwender ungewohnte Form der Eichkurve: In semilogarithmischen Auftragungen erhält man grundsätzlich sigmoidale Kurven. Dies ist durch den kompetitiven Mechanismus bedingt. Diese Form erscheint oft als nachteilig und kann mit mathematischen Linearisierungsmethoden scheinbar beseitigt werden [129]. Hierbei wird jedoch der heteroskedastische Charakter des Meßfehlers oft ignoriert [130]. Da der Fehler mittransformiert wird, erhält man Vertrauensbereiche völlig unerwarteter Gestalt [131]. Linearisierte Eichkurven, die häufigste Methode wird als "Logit/Log" bezeichnet, verleiten den ungeübten Anwender zur Extrapolation in Bereiche unterhalb der Nachweisgrenze (Der Logit-Plot wurde 1944 von BERKSON [132] eingeführt). Auch ist mit Logit-Log-Auftragung oft nur partiell erfolgreich eine Eichgerade zu erreichen: Häufig bleibt eine signifikante Krümmung übrig [49], deren Beseitigung den Fehler der Eichkurve unnötig vergrößert. Es wurde sogar vorgeschlagen, nicht die Auswertung zu verbessern, sondern die Testbedingungen so lange zu variieren, bis sie in das verwendete Modell passen [133]. Linearisierungen werden zudem häufig mit ungeeigneten Regressionsverfahren gekoppelt. Linearisierte Daten erfordern in der Regel eine ausgeprägte Gewichtung der Eichpunkte [134]. Wird dies unterlassen, so erfolgt eine Anpassung an statistisch "verzerrte" Werte [135]. Den Rohdaten besser angepaßt sind Verfahren, die eine nichtlineare Regression der Eichkurve durchführen. Sie sind zwar eindeutig aufwendiger bezüglich des Rechenaufwands, dies kann aber in einer Zeit allgemein verfügbarer Personal-Computer nicht mehr als Einschränkung gelten.

Eine sehr vielseitige, semiempirische Gleichung zur Auswertung von sigmoidalen Eichkurven wurde 1974 von RODBARD (zit. in [136]) eingeführt. Sie ist als 4-parametrische (logistische) Gleichung bekannt und hat gut interpretierbare Parameter. Sie setzt eine sigmoidale Kurvenform voraus und gleicht dadurch kleine Meßfehler sehr zuverlässig aus. Reine Spline-Verfahren sind in dieser Hinsicht deutlich unterlegen: Sie führen oft zu nicht monotonen Funktionen, die als Eichkurven kaum tauglich sind. Eine Gruppe anerkannter Experten hat auf Anregung der Internationalen Atomenergiebehörde (IAEA) Empfehlungen zur Auswertung von Immunoassay-Daten veröffentlicht [136]. In diesem Papier wird die 4-parametrische Gleichung ausdrücklich als gut geeignet bezeichnet<sup>7</sup>. Dagegen werden Linearisierungen

---

<sup>7</sup> "The four-parameter logistic curve appears to be the most generally useful and versatile model that will satisfy the above requirements, ..."

gen (wie z.B. Logit/Log) als nicht mehr sinnvoll angesehen. Viele Fragen zu den Themen Vertrauensbereich, Präzisionsprofile [137], Qualitätskontrolle u.a. werden in dem o.g. Papier diskutiert.

Die für die meisten Eichkurven-Auswertungen verwendete 4-parametrische Gleichung lautet:

$$Y = \frac{(A - D)}{\left[ 1 + \left( \frac{X}{C} \right)^B \right]} + D \quad (\text{Gl. 7})$$

X	Konzentration des Analyten [ $\mu\text{g/L}$ ]
Y	Absorption (450 nm)
A	Maximale Absorption (Obere Asymptote)
D	Minimale Absorption (Untere Asymptote)
C	Testmittelpunkt (50%-Wert) [ $\mu\text{g/L}$ ]
B	Steigungsparameter

Die Kurven in dieser Arbeit wurden auf die folgende Weise normiert:

$$Y_N = \frac{Y - D}{A - D} \cdot 100 = \frac{1}{\left[ 1 + \left( \frac{X}{C} \right)^B \right]} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 8})$$

$Y_N$  entspricht ungefähr der konventionellen Definition von  $B/B_0$ , die Eichkurven werden aber zu konvergentem Verhalten bei  $[\text{Analyt}] \rightarrow 0$  oder  $[\text{Analyt}] \rightarrow \infty$  gezwungen. Diese Normierung hat den entscheidenden Vorteil, daß im Vergleich zu  $B/B_0$  weder ein echter Nullwert (bei kompetitiven Tests mit einem relativ großen Fehler behaftet) noch ein Überschußwert (wegen Löslichkeitsproblemen oft schlecht zugänglich) notwendig ist.

Für asymmetrische Eichkurven kann die 4-parametrische logistische Kurve zu einer 5-parametrischen Funktion erweitert werden (zit. in [138]):

$$Y = \frac{(A - D)}{\left[ 1 + \left( \frac{X}{C} \right)^B \right]^Y} + D \quad (\text{Gl. 9})$$

In dieser Arbeit wurde ansatzweise versucht, robuste statistische Methoden [139] [140][141] zu verwenden: In ELISAs treten z.B. durch Pipettierfehler einzelne krasse Abweichungen vom erwarteten Meßwert auf. Diese "klassischen" Ausreißer lassen sich jedoch nur sehr schwer statistisch sauber detektieren [142], besonders wenn nur wenige Replikate vorliegen, was in Routinemessungen die Regel ist. Das Problem der Ausreißer kann leicht entschärft werden, wenn robuste Statistik angewandt wird. Statt den üblichen arithmetischen Mittelwert z.B. dreier Replikate zu verwenden, wurde der Median (Zentralwert) gebildet. Dieser Mittelwert ist völlig unempfindlich gegen die Anwesenheit von einzelnen Ausreißern. Eine Eliminierung bzw. Korrektur ist also überflüssig. Erst die Mediane wurden einer nicht-linearen Regression unterworfen [143][144]. Ausreißer haben im Normalfall keinen signifikanten Einfluß auf die Eichkurve - nur die Fehlerbalken zeigen die Unregelmäßigkeit an.

## 9 Triazinherbizide

Anfang der fünfziger Jahre waren in erster Linie Phenole und Kresole, Trichloressigsäure, 2,4-D und MCPA als organische Herbizide bekannt [145]. Auch Maleinsäurehydrazid und Aminotriazol hatten eine gewisse Bedeutung. In einigen Laboratorien wurde ein Arbeitshypothese verfolgt, die als "Harnstoff-Triazin-Analogie" bezeichnet wird. Sowohl auf dem pharmazeutischen Sektor, als auch im Bereich der Farbstoffchemie wurden ähnliche Eigenschaften gefunden, wenn man das Harnstoff-Grundgerüst durch ein Triazin-Gerüst ersetzte. Triazin-Analoga der bisher bekannten herbiziden Harnstoffe (z.B. CMU oder Monuron [146]) waren jedoch nicht wirksam.

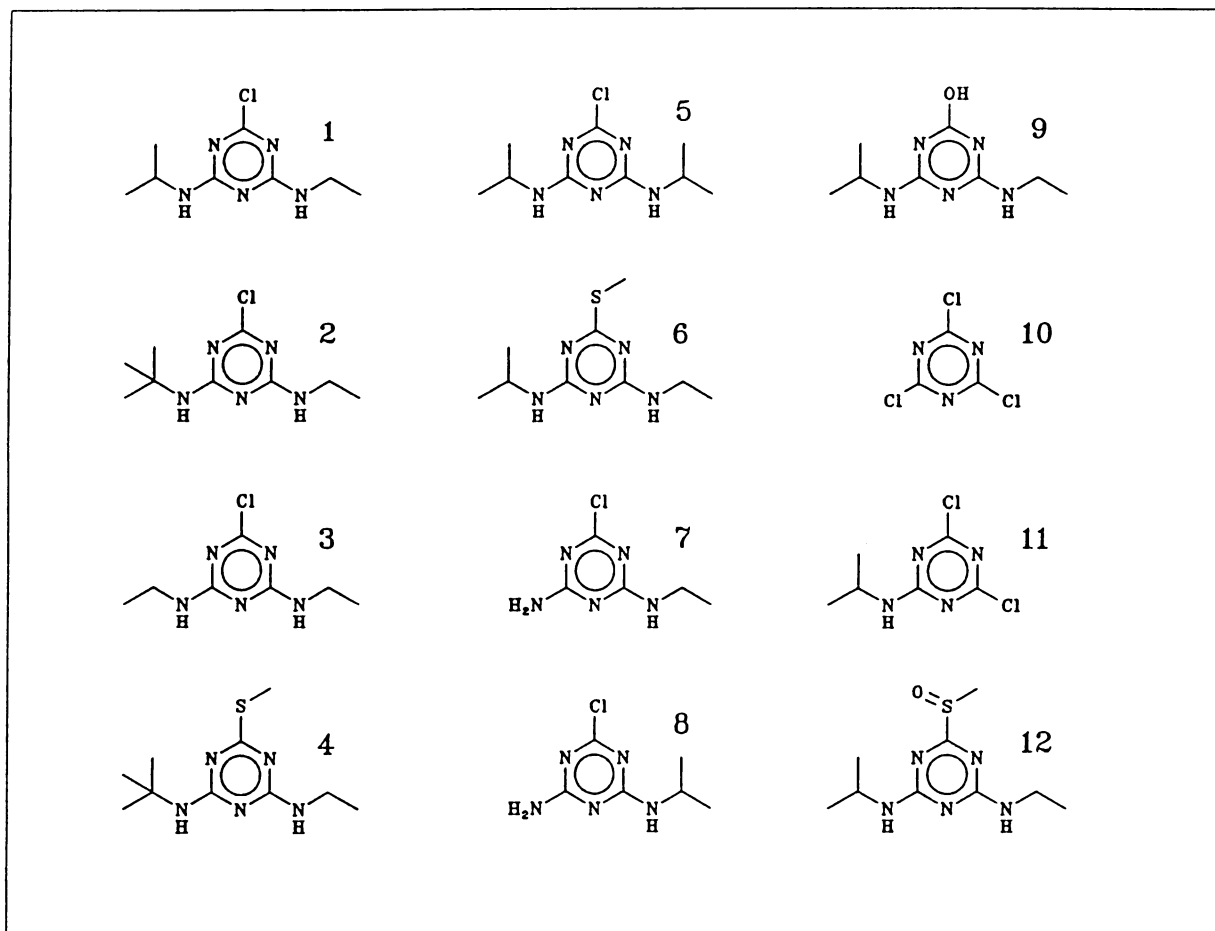
Dagegen waren weitergehende Abwandlungen erfolgreich: 1952 fanden GAST, GYSIN und KNÜSLI [147][148] bei der J.R. Geigy AG (Basel), daß das Triazinderivat Chlorazin wachstumshemmende Eigenschaften auf Pflanzen hat. Bei weiteren Untersuchungen [149] wurde u.a. das Simazin (siehe Abb. 5) entdeckt, das wesentlich verbesserte herbizide Eigenschaften aufwies. Umfangreiche Studien zur Ermittlung einer optimalen Struktur führten zur Entdeckung zahlloser Triazinherbizide [150] (meist mit Alkylamino-, Chlor-, Thio-methyl- oder Methoxy-Substituenten) mit teilweise recht unterschiedlichem Wirkungsspektrum. 1958 [151] wurde dann erstmals das Herbizid Atrazin (siehe Abb. 5) unter dem Handelsnamen "Gesaprim" [152] auf den Markt gebracht. Das Patent der Ciba-Geigy AG lief in den siebziger Jahren aus: Atrazin wird nun weltweit von mindestens 10 verschiedenen

Firmen produziert. Dieses Mittel, das vorwiegend zur Unkrautbekämpfung in Mais [153] eingesetzt wird, war ein entscheidender Durchbruch auf dem Weg zu selektiv wirkenden Herbiziden.

Der enorme wirtschaftliche Erfolg dieses und einiger ähnlicher Präparate hatte jedoch auch zur Folge, daß sich zunehmend Triazin-Spuren in verschiedenen Umweltkompartimenten nachweisen ließen [154]. Auch Metaboliten [155]-[157], die Hydroxyderivate und partiell oder total desalkylierte Produkte umfassen, werden häufig gefunden. Diese Probleme führten zu Bemühungen, die Analytik von Triazin-Herbiziden entscheidend zu verbessern. Besonders die Novellierung der Trinkwasserverordnung in der Bundesrepublik Deutschland im Jahre 1989 führte zu einem enormen Bedarf an hochempfindlichen und praxisgerechten Analysemethoden. Obwohl in Deutschland Atrazin keine Verlängerung der Zulassung erhalten hat, ist damit das Thema Triazine nicht zu einem Abschluß gekommen. Verwandte Stoffe wie das Terbutylazin scheinen die Rolle des Atrazins einzunehmen.

Mechanistisch gesehen gehören Triazinherbizide in die Gruppe der Hemmstoffe des Photosystems II (PS II). Die letale Wirkung von einigen Triazinderivaten auf Pflanzen geht demnach auf eine Unterbrechung der Lichtreaktion der Photosynthese zurück. Im Zusammenhang mit den mit einem Nobelpreis ausgezeichneten Arbeiten über die räumliche Struktur des photosynthetischen Reaktionszentrums von *Rhodospseudomonas viridis* (einem Purpurbakterium) wurden Untersuchungen über die Bindungsstelle des Herbizids Terbutryn angestellt [158][159]. Heute ist klar, daß Triazin-Herbizide als Analoga von Chinonen wirken, die in der Elektronentransportkette des PS II lokalisiert sind. Triazin-Herbizide und andere Photosynthesehemmer verdrängen die redoxaktiven Plastochinone ( $Q_B$ ) aus ihren Bindungsplätzen und nehmen ihre Position ein - ohne jedoch funktionell zu sein. Es wird vermutet, daß nicht die reine Blockierung des Elektronentransports zu den beobachteten toxischen Effekten in Pflanzen führt, sondern daß ein Reparaturmechanismus des Reaktionszentrums gestört wird. Hierdurch würde das Photosynthesesystem an zentraler Stelle lahmgelegt [160]. Andere Hypothesen gehen von einer Zerstörungswirkung durch vermehrt produzierte Radikale aus.

Die Struktur von Triazinherbiziden ist eine etwas detailliertere Beschreibung wert. Die übliche Strukturformel enthält nicht alle Informationen, die Triazine strukturell charakterisieren. So sind die beiden Alkylamin-Substituenten nur sehr wenig basisch und nucleophil, da die freien Elektronenpaare mesomeriestabilisiert sind. Die Stickstoffatome der Substituenten tragen positive Partialladungen. Besonders interessant ist der partielle Doppelbindungscharakter der Substituenten (Abb. 6). Dies gibt einen Hinweis, daß Triazinherbizide teilweise rotationsgehinderte Substituenten tragen, wobei unter bestimmten Bedingungen das Auftreten von Diastereomeren (beim Atrazin z.B. 4) möglich wäre. Welche Konformation tatsächlich energetisch begünstigt ist, kann ohne gezielte Untersuchungen nicht unterschieden werden. Daß derartige Informationen für die immunologische Beurteilung von Analyten und deren Derivate sehr aufschlußreich sein können, ist offensichtlich. Für einen Antikörper stellen Isomere oder auch Enantiomere meistens völlig unähnliche Verbindungen dar [9].



**Abb. 5: Triazinherbizide, Metaboliten und andere Derivate.** 1 Atrazin, 2 Terbutylazin, 3 Simazin, 4 Terbutryn, 5 Propazin, 6 Ametryn, 7 Desisopropyl-Atrazin, 8 Desethyl-Atrazin, 9 Hydroxy-Atrazin, 10 Cyanurchlorid, 11 *i*-Propylamino-dichlor-triazin, 12 Ametrynsulfoxid.

Doch nicht nur Mesomerie muß bei Triazinen beachtet werden, auch Tautomerie tritt häufig auf. So können nicht nur die Stickstoffatome der Substituenten protoniert werden, sondern auch der Ringstickstoff (Abb. 7). Bei den Tautomeren sind gleichfalls Doppelbindungen zu den Substituenten möglich, was die Rotation stark behindern dürfte. Daß diesen Tautomeren Realität zukommt, erkennt man, wenn man ein Kernresonanzspektrum eines Triazinherbizids zu interpretieren versucht. In Tabelle 3 wurde nur der Teil des Spektrums<sup>8</sup> angegeben, der die Wasserstoffatome im Heterobereich enthält. Die Summe der NH-Protonen beträgt 2. Addiert man die Beiträge der Ringprotonen und der Aminprotonen, so kann man aus dem Verhältnis, die relativen Konzentrationen der Spezies berechnen. Man erhält in diesem Fall 62.6 % Stammverbindung und 37.4 % Ringtautomere (in D<sub>6</sub>-DMSO). Analoge Beobachtungen kann man bei protonenentkoppelten <sup>13</sup>C-NMR-Spektren machen, bei denen insbesondere im Ring-Kohlenstoff-Bereich (ca. 165 ppm) starke Aufspaltungen sichtbar sind (mindestens 6 Peaks statt 3), die wahrscheinlich auf die ringprotonierten Spezies zurückzuführen sind.

<sup>8</sup> Frau P. Ulrich sei für die Überlassung des NMR-Spektrums (270 MHz) gedankt.

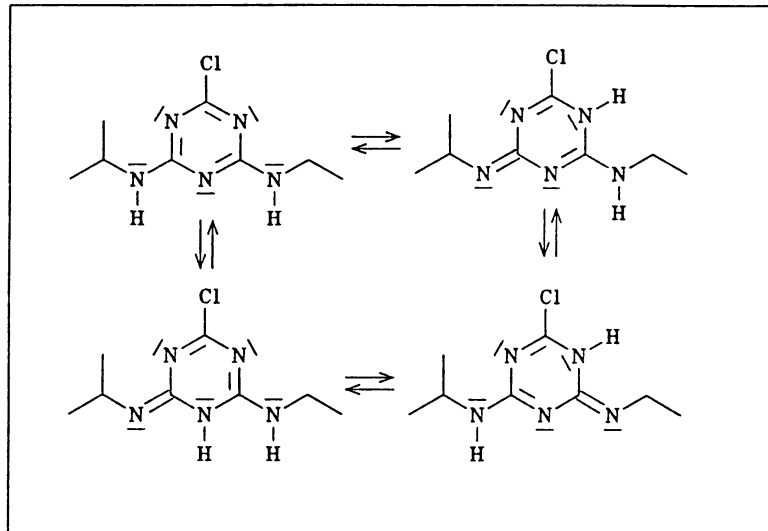


Abb. 6: Mesomeriestabilisierung des Atrazins.

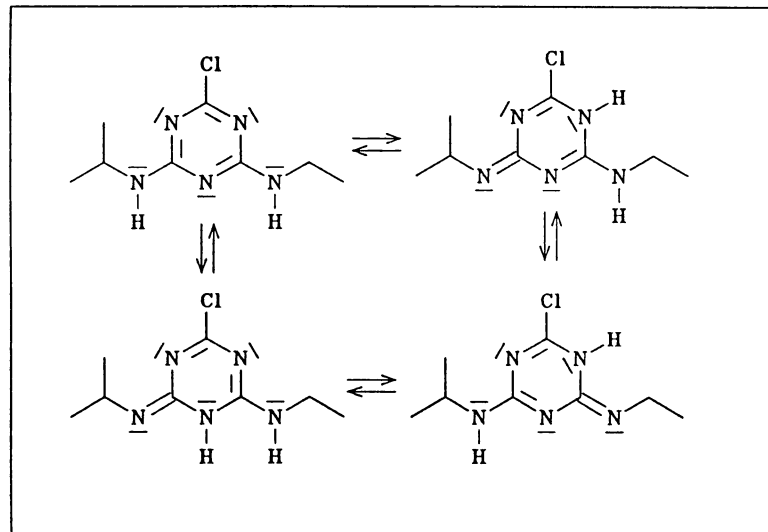


Abb. 7: Tautomere des Atrazins (Auswahl). Es können alle Ringstickstoffatome in protonierter Form vorliegen.

Tabelle 3:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Terbutylazin (Peaks von 7-8 ppm).

Verschiebung [ppm]	Multiplizität	Integral [%]	Interpretation
7.82	Triplett	106.6	Ethylamin-NH
7.63	Singulett (breit)	16.2	Ring-NH
7.52	Singulett	100.0	Isopropylamin-NH
7.35	Singulett (?)	20.4	Ring-NH
7.28	Singulett (?)	10.85	Ring-NH

## 10 Immunoassays in der Medizin

Die ursprüngliche Domäne der Anwendung von Immunoassays ist zweifellos die medizinische Diagnostik [161]. Schon 1977 wurden bei einer Marktübersicht [162] für Radioimmunoassays (RIA) 300 Tests für 62 verschiedene klinische Parameter aufgeführt. Betrachtet man die inhärenten Stärken von Immunoassays, so liegen sie insbesondere im Bereich der großen Moleküle, der hydrophilen, thermisch labilen und schwer extrahierbaren Substanzen in komplexen Matrices, die auf andere Weise nur mühsam oder gar nicht analysierbar sind. Prinzipiell kann jedoch für fast jede denkbare Verbindung ein Immunoassay hergestellt werden. Die Bestimmung von Viren, Bakterien und anderen Mikroorganismen kann auf klassisch analytische Weise nur auf sehr unvollkommene Weise erfolgen. Dagegen bieten Antikörper mit ihrer natürlichen Fähigkeit auf charakteristischen Oberflächenprofilen selektiv zu binden einen direkten Ansatz, Mikroorganismen in sehr niedrigen Konzentrationen schnell zu identifizieren. Oft werden nicht die Erreger selbst nachgewiesen, sondern die im Körper des Patienten vorhandenen Antikörper.

Im klinischen Sektor hat die Bestimmung von Peptid-, Steroid- und Schilddrüsen-Hormonen [163] einen besonderen Stellenwert. Die Abweichung von "Normbereichen" gilt als wichtiger Indikator zur Diagnose unterschiedlichster Krankheiten. Daher hat sich die Untersuchung des Serumspiegels verschiedener Hormone zu Routinemethoden entwickelt. Die sog. Schwangerschaftstests [164], die teilweise auch von Laien durchgeführt werden können, basieren auf dem Nachweis des Schwangerschaftshormons HCG im Urin.

Ein gleichfalls wichtiger klinischer Anwendungsbereich ist die Kontrolle der Konzentration von pharmazeutischen Präparaten und deren Metaboliten im Blut. Bei einigen Medikamenten ist der Abstand zwischen wirksamer und toxischer Dosis relativ klein: Hier ist eine laufende Kontrolle des Serumspiegels zur Einstellung der richtigen Konzentration indiziert [165].



Proteingemische lassen sich chromatographisch zwar oft auftrennen, die Identifizierung der in zahllosen Variationen auftretenden Moleküle ist jedoch eine schwierige Angelegenheit. Da die Immunisierung mit Proteinen in der Regel problemlos gute Antiseren bzw. Antikörper ergibt, können Proteine mit immunchemischen Methoden auch in Gemischen leicht detektiert und quantifiziert werden. Proteine sind nicht nur von der Immunisierung her günstige Analyten, die hohe Molmasse erleichtert auch in anderen Aspekten die Entwicklung von Immunoassays: So ermöglichen hohe Affinitätskonstanten und die Anwesenheit mehrerer unterschiedlicher Epitope die Anwendung vieler Immunoassay-Varianten, die bei Haptenen nicht oder nur sehr beschränkt eingesetzt werden können. Bei diesen Anwendungen bieten sich besonders nicht-kompetitive Verfahren an.

## 11 Immunoassays in der Umweltanalytik

1968 wurde erstmalig von der Herstellung von Antikörpern gegen Insektizid-Konjugate (Parathion) berichtet [166]. 1970 publizierte CENTENO [167] eine Arbeit über DDT- und Malathion-Antikörper. Der erste Immunoassay für die Bestimmung von Pestiziden (Dieldrin, Aldrin) wurde jedoch erst 1975 von LANGONE und VAN VUNAKIS vorgestellt [168]. In der Folge wurden in unregelmäßigen Abständen gegen weitere Umweltkontaminanten Immunoassays aufgebaut [169]. Doch erst in den letzten 5 Jahren hat sich die Geschwindigkeit der Entwicklung merklich beschleunigt. Es sind heute schon eine größere Anzahl an Pestizid-ELISAs kommerziell verfügbar, auch wenn die Qualität dieser Produkte oft noch Wünsche offen läßt. In der Umweltanalytik [170][171] oder Rückstandsanalytik [172] werden an Immunoassays andere Ansprüche gestellt im Vergleich zu klinischen Anwendungen. So sind in der Umweltanalytik in der Regel quantitative Ergebnisse gefordert, die auch statistischen Kriterien entsprechen sollen. Die Empfindlichkeit muß bis zu physikochemischen Grenzen optimiert werden, um Ultraspuren quantifizieren zu können. Auch haben die Analyten in der Regel eine niedrige Molmasse, was die Entwicklung sensitiver Immunoassays erschwert.

Trotz dieser oft atypischen Anforderungsprofile konnten ELISAs für die Bestimmung von Umweltchemikalien hergestellt werden, die klassische analytische Methoden in puncto Sensitivität, Geschwindigkeit und Kosten weit in den Schatten stellen. Doch auch andere Vorzüge von Immunoassays kommen in der Umweltanalytik zum Tragen: So kann mit nur 100 µL Probe eine analytische Bestimmung im Ultraspurenbereich mittels ELISA durchgeführt werden. Für chromatographische Methoden sind mindestens 1000-10.000fach höhere Probenmengen erforderlich. Diese Unterschiede sind z.B. für die direkte Bestimmung von Atrazin im Nebel [173] bzw. im Niederschlagswasser [174] von entscheidender Bedeutung. Auch Studien zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von Pestiziden können vorteilhaft mit Immunoassays durchgeführt werden [175]. Zudem können Immunoassays so optimiert werden, daß eine schnelle quasi-on-line-Analytik möglich wird. Im Gegensatz zu klassischen Methoden, die langwierige Anreicherungs- und Cleanup-Schritte erfordern, kann ein Immunoassay fast ohne Vorbereitung in 30 Minuten die Resultate von z.B. 50 Proben liefern.

Dies zeigt auch die Vorteile der Parallelverarbeitung vieler Proben: So kann der Probendurchsatz im Routinelabor leicht zwei Größenordnungen höher liegen verglichen mit einer gaschromatographischen Methode. Nur so lassen sich mit vertretbarem finanziellem Aufwand häufige Kontrollmessungen bzw. Screening-Projekte [176] durchführen.

Nachteilig an Immunoassays ist das Problem der Kreuzreaktionen. Bei Durchführung eines einzelnen Immuntests können nur Äquivalente bestimmt werden. Die chemische Identifizierung einer Substanz fehlt primär und kann nur durch zusätzliche Information über die betreffende Probe erhalten werden. Dieser Nachteil kann jedoch mittels ELISA-Kombinationen ausgeglichen werden. Auch liefert ein Immunoassay immer nur einen Meßwert pro Test: Eine Multianalytfähigkeit ist im Gegensatz zu chromatographischen Verfahren nicht vorhanden. Bisher ist allen Immunoassays der hohe Aufwand bei der Entwicklung gemeinsam. Für monoklonale Antikörper gilt dies in besonderem Maße. Daher sind Immunoassays nicht für sich rasch ändernde Analysenaufgaben geeignet, falls noch keine kommerziellen Tests erhältlich sein sollten. Die hohen Investitionen für Immunoassays werden daher eher für längerfristige Problemstellungen eingesetzt. Auch hohe Probenzahlen machen einen Immunoassay gegenüber klassischen Verfahren interessant.

Gesetzliche Maßnahmen zur Verhinderung von Grundwasserverunreinigungen sind häufig mit einem hohen Vollzugsdefizit behaftet. Die Durchsetzung gesetzlicher Regelungen kann augenscheinlich nur mit einem ausreichenden Maß an Kontrolle aufrecht erhalten werden. Zieht man für diesen Zweck klassische analytische Methoden in Betracht, so wird man feststellen, daß eine flächendeckende Kontrolle astronomische Kosten verursachen würde. Immunoassays sind dagegen preiswert und schnell: Sie eignen sich besonders zur laufenden Kontrolle von Trinkwasserbrunnen oder landwirtschaftlich genutzten Böden [176].

Trotz der in einer großen Anzahl entwickelten Pestizid-Immunoassays [177]-[180] ist heute immer noch die schlechte kommerzielle Verfügbarkeit von Immunoassays limitierend für die praktische Anwendung. So wurden bei einer kürzlich veröffentlichten Marktübersicht [181] nur 18 unterschiedliche Kits für 9 Substanzen angeboten. Der Vergleich mit der Marktübersicht im Abschnitt "Immunoassays in der Medizin" zeigt die augenblickliche Situation überdeutlich.

## 12 Triazin-Immunoassays

Die Anzahl der Publikationen auf dem Sektor der Immunoassays, die Triazin-Herbizide nachweisen können, ist jetzt schon auf eine stattliche Zahl angewachsen [47][182]-[208].

Daher ist die Entscheidung, Hapten-Immunoassays speziell am Beispiel von Triazin-Herbiziden zu untersuchen, nicht nur auf die synthetisch gut zugänglichen Derivate, sondern auch auf die zahlreichen Vergleichsmöglichkeiten mit schon existierenden Tests zurückzuführen. Gerade die teilweise von Zufällen beherrschte Gewinnung von Antikörpern konnte nur sinnvoll diskutiert werden, weil eine verhältnismäßig große Anzahl unterschiedlichster Antikörper (sowohl polyklonal, als auch monoklonal) zur Verfügung stand. Ähnliche Untersuchungen sind aus diesem Grund bei anderen Stoffklassen momentan kaum durchführbar.

Die Qualität von Triazin-ELISAs scheint jedoch eher zu stagnieren. Eine Hauptfragestellung, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollte, könnte man folgendermaßen formulieren:

Welche Parameter beeinflussen die Sensitivität und Selektivität von Triazin-ELISAs und wie kann man gezielt optimale Eigenschaften erreichen? In diesem Zusammenhang interessiert natürlich besonders der "Stand der Technik", der sich am besten aus einer Zusammenstellung der aus der Literatur angegebenen Test-Charakteristika ersehen läßt (Tabelle 4).

Es wurden nur Triazin-Immunoassays in die Liste aufgenommen, für die allgemein zugängliche wissenschaftliche Literatur vorliegt. Kommerzielle Tests, die oft schlecht charakterisiert sind und bei denen die Struktur bzw. Zusammensetzung der Komponenten geheimgehalten wird, wurden in der Regel nicht aufgeführt, da sie keine sinnvollen Rückschlüsse zulassen.

Bedauerlicherweise sind für die aufgeführten Antikörper keine (verläßlichen) Affinitätskonstanten publiziert worden. Die von den betreffenden Autoren angegebenen Nachweisgrenzen können nur als grober Anhaltspunkt dienen, da verschiedene Definitionen verwendet wurden. Zudem sind die Tests wahrscheinlich unterschiedlich gut optimiert.

Die hier vorliegende Arbeit beinhaltet keine Daten zum Thema Applikation bzw. Verifizierung. Der Leser sei auf die zitierten Originalarbeiten verwiesen. Bei den meisten Publikationen sind auch Teile enthalten, die sich der Validierung der Tests widmen. Zusätzlich sind jedoch auch Arbeiten erschienen, deren Hauptanliegen der Vergleich von Immunoassays mit bewährten Standardmethoden (GC, GC-MS, HPLC) oder die Diskussion über Fehlermöglichkeiten ist [209]-[213].

Tabelle 4: Vergleich der bisher publizierten Triazin-Immunoassays.

Analyt	NG <sup>1</sup> [ $\mu\text{g/L}$ ]	Typ <sup>2</sup>	AK-Nr. <sup>3</sup>	Hapten für Immunisierung	
Atrazin	1.1 <sup>4</sup>	K-pAK AKI	-	Ametrynsulfoxid	[182]
Terbutryn	25	K-pAK AKI	-	Ametrynsulfoxid	[183]
Terbutryn	0.1	K-pAK AKI	-	Ametrynsulfoxid	[184]
Atrazin	0.1	K-pAK AKI	-	Hapten unbekannt	[185]
Atrazin	0.05	mAK HI	4063-21-1	C <sub>5</sub> -Spacer (i-Pr/Cl/C5)	[187]
Hydroxyatrazin	0.1	mAK HI	4009-85-3	C <sub>5</sub> -Spacer (i-Pr/OH/C5)	[187]
Hydroxyatrazin	0.05	mAK HI	4009-77-20	C <sub>5</sub> -Spacer (i-Pr/OH/C5)	[187]
Atrazin	0.1	K-pAK HI	rabbit 3	C <sub>6</sub> -Spacer (i-Pr/Cl/C6)	[186]
Atrazin	0.1	K-pAK AKI	C2	C <sub>6</sub> -Spacer (i-Pr/Cl/C6)	[194]
Atrazin	< 0.01	K-pAK AKI	C193	C <sub>6</sub> -Spacer (i-Pr/Cl/C6)	[194]
Desethylatrazin	0.01	K-pAK AKI	C10	C <sub>6</sub> -Spacer (H/Cl/C6)	[195]
Atrazin	0.1	K-pAK AKI	AK 20	Ametrynsulfoxid	[192]
Atrazin	0.03	S-pAK AKI	S84	C <sub>6</sub> -Spacer (i-Pr/Cl/C6)	[196]
Terbutryn	0.1	mAK AKI	K1F4	Ametrynsulfoxid	[201]
Prometryn	0.3	mAK AKI	K1A11	Ametrynsulfoxid	[201]
Aziprotryn	1	mAK AKI	C3K5	ohne Spacer (i-Pr/Cl/Cl)	[201]
Terbutylazin	0.14	mAK AKI	P6A7	ohne Spacer (i-Pr/Cl/Cl)	[47]
Atrazin	0.05	K-pAK AKI	-	Hapten unbekannt	[208]
Atrazin	ca. 3.3 <sup>5</sup>	K-pAK AKI	194	C <sub>3</sub> -Spacer (i-Pr/Et/3MPS)	[206]
Atrazin	ca. 2.0 <sup>5</sup>	K-pAK AKI	357	C <sub>6</sub> -Spacer (i-Pr/Cl/C6)	[206]
Atrazin	0.03	mAK AKI	AM7B2.1	C <sub>3</sub> -Spacer (i-Pr/Et/3MPS)	[207]
Atrazin	ca. 2.6 <sup>5</sup>	mAK AKI	AM5D1.1	C <sub>3</sub> -Spacer (i-Pr/Et/3MPS)	[206]

<sup>1</sup> Nachweisgrenze; die Werte wurden den angegebenen Publikationen entnommen und sind aufgrund unterschiedlicher Definitionen nur begrenzt vergleichbar.

<sup>2</sup> Antikörper: mAK (Maus, monoklonal), K-pAK (Kaninchen, polyklonal), S-pAK (Schaf, polyklonal), Test-Konfiguration: AKI (Antikörper-Immobilisierung), HI (Hapten-Immobilisierung).

<sup>3</sup> Antikörper-Nummer, interne Bezeichnungen

<sup>4</sup> In dieser Arbeit werden für bestimmte Konfigurationen Nachweisgrenzen von 0.00011  $\mu\text{g/L}$  (110  $\text{pg/L}$ ) angegeben. Diese Werte sind kaum nachzuvollziehen.

<sup>5</sup> Abgeschätzt aus  $\text{NG} = 0.1 \cdot C$  (Testmittelpunkt C)

## II. THEORIE

## 1 Kinetik von Enzymimmunoassays

## 1.1 Allgemeines

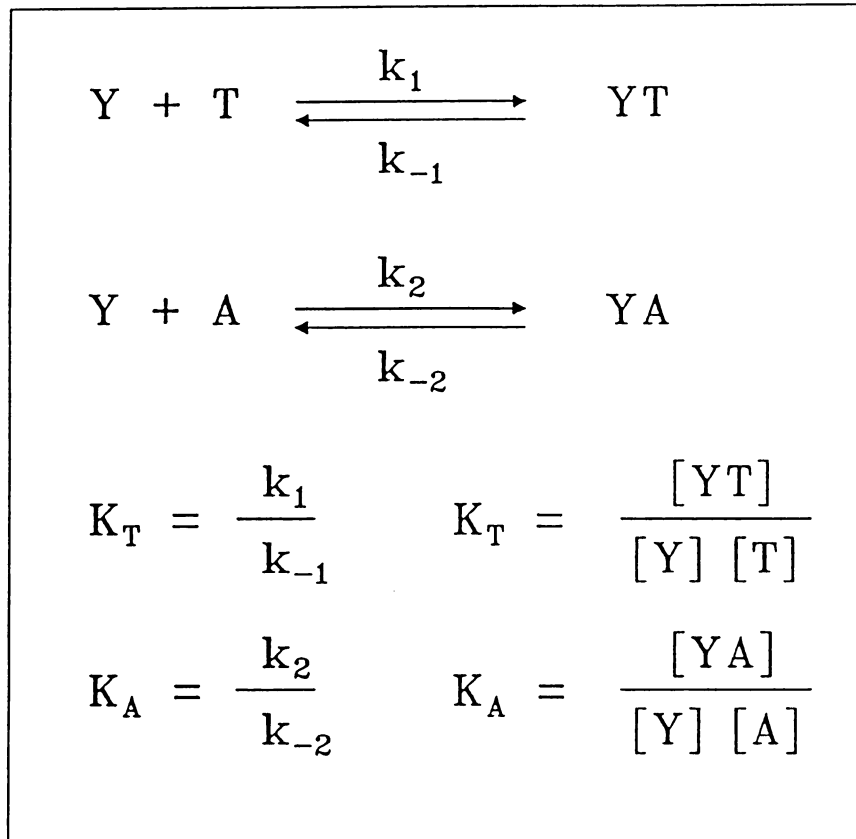
Es ist erstaunlich, daß erst relativ wenige Versuche unternommen wurden, die Kinetik von ELISAs quantitativ zu erfassen. Daher sollen einige Anmerkungen über den Sinn und Zweck solcher Untersuchungen gemacht werden.

Zeitabhängige Schritte sind bei Immunoassays schon von frühester Zeit an bekannt. Doch meist beschränkte man sich damit, qualitative Interpretationen vorzunehmen. Entsprechend widersprüchlich und für den Einzelfall wenig aussagekräftig waren daher die Ergebnisse. Es können jedoch nur gültige Schlußfolgerungen gezogen werden, wenn das entsprechende Datenmaterial vorliegt. Die bisher routinemäßig eingesetzten Methoden sind nur schwerlich geeignet, Immunoassays systematisch zu klassifizieren.

In vielen Arbeitsgruppen ist die Ansicht verbreitet, ein Immunoassay müsse empirisch charakterisiert und optimiert werden. In einer frühen Phase der Entwicklung einer Testmethode mag das zwar noch angemessen sein, aber über 20 Jahre nach der Vorstellung der ersten Enzymimmunoassays erscheint dies ein zu wenig leistungsfähiger Ansatz. Nur durch die systematische Untersuchung sämtlicher Parameter, die einen Immunoassay beeinflussen können, ist zu erwarten, daß die Entwicklung von Immunoassays endlich den Sprung von einer vom Zufall geleiteten Suche zu einem gezielten Design machen kann. Der hohe Arbeitsaufwand bei einer Neuentwicklung eines Tests kann nicht gerechtfertigt werden, wenn man unzählige Male in Sackgassen gerät. Es müssen Strategien gefunden werden, Immunoassays definierter Qualität in begrenzter Zeit aufzubauen. Die schlechte Verfügbarkeit, ein Hauptmangel bei Immunoassays, ist zu einem großen Teil darauf zurückzuführen, daß es ein erhebliches finanzielles Risiko darstellt, in die Entwicklung eines Immunoassays zu investieren. Aufgrund der unsicheren wissenschaftlichen Grundlagen hängt es in hohem Maße vom Zufall bzw. der Intuition des Forschers ab, ob der Test am Ende den Anforderungen der Anwender entspricht.

Bei einem ELISA handelt es sich um eine Reaktion an einer Phasengrenze. Es existiert also keine homogene Lösung und es muß mit Grenzflächeneffekten gerechnet werden. Daher sind alle Angaben von Gleichgewichtskonstanten und kinetischen Konstanten als sog. "scheinbare" Konstanten aufzufassen, die nicht zwangsläufig mit üblichen thermodynamischen oder kinetischen Konstanten identisch sein müssen. So können z.B. durchaus diffusionslimitierte Schritte in den Assoziationskonstanten enthalten sein, die in homogener Lösung nicht auftreten müssen. Dies schmälert jedoch den Wert solcher Untersuchungen nur marginal, da vorläufig "nur" die Formal-Kinetik eines ELISAs möglichst umfassend beschrieben werden soll. Die genauen Mechanismen, die diese Formalkinetik hervorrufen, müssen erst durch

weitere Untersuchungen geklärt werden. In Abb. 8 sind die wichtigsten Reaktionsgleichungen und die Bezeichnungen der Konstanten definiert.



**Abb. 8:** Definitionen der wichtigsten kinetischen und thermodynamischen "Konstanten". *Y* Antikörperkonzentration (monovalent), *T* Tracerkonzentration (monovalent), *A* Analytkonzentration,  $k_1$  Assoziationskonstante (Tracer),  $k_{-1}$  Dissoziationskonstante (Tracer),  $k_2$  Assoziationskonstante (Analyt),  $k_{-2}$  Dissoziationskonstante (Analyt),  $K_T$  Gleichgewichtskonstante (Tracer),  $K_A$  Gleichgewichtskonstante (Analyt).

## 1.2 Reaktionsordnungen

Es war nicht Ziel dieser Arbeit, die Reaktionsmechanismen einer Antikörper/Antigen-Reaktion im Detail zu untersuchen. Dies liegt wohl auch außerhalb des Bereichs, der mit einem begrenzten apparativen Aufwand bewältigt werden kann. Die Beschreibung als Formal-Kinetik kann trotzdem schon sehr hilfreich zur Erklärung vieler Effekte sein. Für den stöchiometrischen Ansatz wurde davon ausgegangen, daß Antikörper und Tracer nur eine Bindungsstelle betätigen können, für die Analyten gilt dies zweifellos. Diese Vereinfachung stellt m.E. keine wichtige Einschränkung für Hapten-Immunoassays dar. Die Ergebnisse, auch die der Simulationen (siehe S. 76), lassen nicht darauf schließen, daß hier Probleme aufgetreten sind.

Der stöchiometrische Ansatz wurde als Anhaltspunkt für die Ordnungen der Reaktionen benutzt. Die Reaktionsordnung bezüglich des Analyten wurde in dieser Arbeit nicht überprüft, da hierzu ein direktes Monitoring der Antikörper/Hapten-Reaktion notwendig ist. Daten aus der Literatur [214] geben aber den Hinweis, daß davon ausgegangen werden kann, daß die Reaktion des Analyten mit der Bindungsstelle pseudo-erster Ordnung abläuft und die Rückreaktion einer Dissoziation erster Ordnung entspricht.

### 1.3 Dissoziationskonstanten

Die Dissoziationskonstante eines Antikörper-Tracer-Komplexes läßt sich verhältnismäßig einfach bestimmen. Hierzu kann man z.B. Waschversuche durchführen, bei denen vom "Gleichgewicht" ausgehend, die Bulk-Phase plötzlich ausgetauscht wird und die Konzentration des freien Tracers auf nahezu Null absinkt. Es sollte sich im einfachsten Fall eine exponentielle Abnahme ergeben, die sich über die Halbwertszeit leicht charakterisieren läßt. Vorteilhaft an diesem Fall ist auch, daß eine Dissoziationskonstante in diesem Fall unabhängig von der Konzentration des Komplexes ist.

Die Dissoziationskonstante des Antikörper-Analyt-Komplexes ist wesentlich schwieriger zu bestimmen, sollte nicht der seltene Fall vorliegen, in dem man die Antikörper-Analyt-Bindung direkt (z.B. durch Fluoreszenzlöschung, Verschiebung von Absorptionsbanden u.ä.) verfolgen kann. Im allgemeinen Fall muß indirekt über die Konkurrenz mit dem Tracer auf den momentan noch gebundenen Anteil des Analyten geschlossen werden. In der Praxis treten zudem noch zeitliche Probleme auf, da der Zerfall eines Antikörper/Analyt-Komplexes in wenigen Sekunden abgeschlossen sein kann. Nur "langsamere" Antikörper, die jedoch günstigerweise oft zu den hochaffinen gehören, können mit einer üblichen Mikrotiterplatten-Technologie vermessen werden.

### 1.4 Assoziationskonstanten

Assoziationskonstanten von Tracern mit Antikörpern lassen sich problemlos messen - vorausgesetzt man kennt die Konzentrationen der beteiligten Reaktanden. Bedauerlicherweise ist dies fast nie der Fall. Konzentrationsmessungen werden auf S. 45 genauer diskutiert. Abgesehen von diesem schwierigen Problem ist die Messung in einer Mikrotiterplatte leicht möglich. Man pipettiert in definierten Zeitabständen Tracerlösung in die Kavitäten, wäscht am Ende die gesamte Platte und entwickelt sie wie üblich. Die verschiedenen Inkubationszeiten entsprechen verschiedenen Reaktionsdauern. Es kann dann ein Plot Absorption gegen Zeit aufgestellt werden (siehe S. 112 ff.). Aus der Anfangssteigung, den Konzentrationen der Reaktionspartner und der Absorption der Tracer-gesättigten Platte (um Absorptionen in Konzentrationen umrechnen zu können) läßt sich dann die Assoziationskonstante bestimmen.

Auch bei der Bestimmung der Assoziationskonstanten von Analyten stößt man auf einige Schwierigkeiten: Prinzipiell ist es denkbar, aus der notwendigen Vorinkubationszeit eine Geschwindigkeitskonstante zu errechnen. Schwierig ist dies wegen der indirekten Meßmethode, es muß immer ein Tracer zugegeben werden, der eine endliche Zeitspanne zur Bindung benötigt. Durch die Verdünnung wird auch die Analytkonzentration stark verändert, was die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflusst. Auf diese Weise sind wahrscheinlich nur Schätzungen der Assoziationskonstanten möglich. Dies könnte jedoch für viele Anwendungen schon ausreichen.

CHEN et al. [215] haben im Zusammenhang mit der beschleunigenden Wirkung von Ultraschall Assoziationskinetiken gemessen. Zwar wird dies nicht explizit erwähnt, aber es konnten nur relative Konstanten bestimmt werden. Die Konzentration des  $^{125}\text{I}$ -gelabelten HCG (human chorionic gonadotropine) wurde zwar konstant gehalten, es wäre aber notwendig gewesen, die molare Konzentration aller beteiligten Komponenten zu messen. Interessanterweise wird keine Abhängigkeit von der HCG-Konzentration gefunden, was eine Reaktion nullter Ordnung bzgl. HCG bedeutet. Dies ist recht schwierig zu erklären, da sowohl diffusionskontrollierte als auch reaktionslimitierte Prozesse eine Konzentrationsabhängigkeit zeigen. Eigentlich sollten nur Reaktionen, die eine Sättigung zeigen (z.B. Michaelis-Menten Enzym-Kinetik) konzentrationsunabhängig werden können.

## 1.5 Gleichgewichtskonstanten

Gleichgewichtskonstanten werden auch Affinitätskonstanten, Bindungskonstanten, manchmal verwirrenderweise "Assoziationskonstanten" genannt. Der Kehrwert der Gleichgewichtskonstante ist auch als "Dissoziationskonstante" im Gebrauch. Beide Begriffe in Anführungszeichen werden hier aber durchgehend im Sinne von Ratenkonstanten (Geschwindigkeitskonstanten) verwendet. Gleichgewichtskonstanten sind durch das Massenwirkungsgesetz definiert und lassen sich einfach bestimmen, wenn man die Konzentrationen der beteiligten Reaktanden messen kann. Gleichgewichtskonstanten sind auch im Bezug auf kinetische Fragestellungen interessant. Da, wie oben schon ausgeführt, die Messung verschiedener kinetischer Konstanten mit teilweise erheblichen Hindernissen verbunden ist, ist es oft eleganter, auf die relativ genau bestimmbare Gleichgewichtskonstante auszuweichen. Kinetische Konstanten und die Gleichgewichtskonstante sind bei reversiblen Reaktionen direkt mathematisch verknüpft.

Für die Messung von Gleichgewichtskonstanten existieren unzählige Verfahren, wobei keine Methode ohne einschneidende Nachteile ist.



Bei KLOTZ [216] wird in einer Tabelle übersichtlich dargestellt, welche prinzipiellen Möglichkeiten zur Bestimmung der Affinitätskonstante bestehen. Sie lassen sich in drei Hauptklassen einteilen:

- 1) Bestimmung der Konzentration des freien Liganden
- 2) Veränderung der Eigenschaften des gebundenen Liganden
- 3) Veränderung der Eigenschaften des Bindungsmoleküls (hier: Antikörper)

Zur ersten Klasse gehört die Gleichgewichtsdialyse [216]. Ähnlich funktionieren Ultrafiltration, Ultrazentrifugation und Gelfiltration.

In einem Gefäß, das mit einer semipermeablen Membran aufgeteilt ist, befindet sich auf einer Seite der Antikörper, auf der anderen das Hapten (Ligand). Da das kleine Hapten die Poren passieren kann, wandert es in die Antikörperlösung. Im Falle verschwindend kleiner Affinität wäre nach einiger Zeit die Konzentration des Haptens auf beiden Seiten identisch, bei unendlich hoher Affinität würde das Hapten quantitativ zur Antikörperseite wandern. Aus dem sich einstellenden Konzentrationsunterschied, läßt sich nun eine Gleichgewichtskonstante errechnen. Als Schwierigkeit tritt auf, daß meistens eine Korrektur für die unspezifische Bindung notwendig ist. Problematisch an diesem Verfahren sind u.a. die lange Versuchsdauer (Gleichgewichtseinstellung), die relativ große Menge an benötigtem Bindungsprotein und die zahlreichen Fehlerquellen.

Besonders eingehen möchte ich auf die sehr verbreitete Methode des SCATCHARD-Plots [217][218]. Üblicherweise wird ein radioaktiver Ligand hergestellt, der in variierenden Konzentrationen mit dem zu untersuchenden Antikörper versetzt wird. Nach einer Gleichgewichtseinkubation wird ein Trennungsschritt zwischen gebundenem und freiem Hapten durchgeführt. Dies wird z.B. durch Zugabe halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung oder durch Polyethylenglycol und anschließender Zentrifugation erreicht. Dann werden die Überstände im Counter vermessen.

Der SCATCHARD-Plot wird aus dem Massenwirkungsgesetz hergeleitet und führt zu einer Linearisierung der Daten.

Aus

$$K = \frac{[YA]}{[A][Y]} \quad \text{und} \quad [YA] = x \quad (\text{Gl. 10})$$

mit  $x$  als der Reaktionslaufzahl ergibt sich:

$$K = \frac{x}{([A]_0 - x) \cdot ([Y]_0 - x)} \quad (\text{Gl. 11})$$

Umgeformt erhält man:

$$\frac{x}{[A]_0 - x} = K[Y]_0 - Kx \quad (\text{Gl. 12})$$

oder:

$$\frac{\text{Analyt}_{geb.}}{\text{Analyt}_{frei}} = -K \cdot \text{Analyt}_{geb.} + K[Y]_0 \quad (\text{Gl. 13})$$

Trägt man nun  $\text{Analyt}_{geb.}/\text{Analyt}_{frei}$  gegen  $\text{Analyt}_{geb.}$  auf, so erhält man im Idealfall eine Gerade mit der Steigung  $-K$  und dem Abszissenabschnitt  $K \cdot [Y]_0$ .

Aus der Steigung der Gerade kann also die Gleichgewichtskonstante, aus dem Abszissenabschnitt die Konzentration der Bindungsstellen abgelesen werden.

Eine im Prinzip ähnliche Auftragung stellt der LANGMUIR-Plot [219] dar. Auch er basiert auf dem Massenwirkungsgesetz.

Aus

$$K = \frac{[YA]}{[A][Y]} = \frac{x}{[A] \cdot ([Y]_0 - x)} \quad (\text{Gl. 14})$$

mit  $x$  als der Reaktionslaufzahl ergibt sich:

$$K = \frac{x}{[A][Y]_0 - [A]x} \quad (\text{Gl. 15})$$

Umformen führt zu

$$K[A][Y]_0 - K[A]x = x \quad (\text{Gl. 16})$$

und

$$K[A][Y]_0 = x(1 + K[A]) \quad (\text{Gl. 17})$$

Man erhält:

$$\frac{1}{x} = \frac{1 + K[A]}{K[A][Y]_0} = \frac{1}{K[A][Y]_0} + \frac{1}{[Y]_0} \quad (\text{Gl. 18})$$

Aus Gleichung 19

$$\frac{1}{[YA]} = \frac{1}{[A]_0 - [A]} = \frac{1}{K[A][Y]_0} + \frac{1}{[Y]_0} \quad (\text{Gl. 19})$$

ist ersichtlich, daß man nur den Kehrwert der Komplexkonzentration gegen den Kehrwert der Konzentration des freien Analyten auftragen muß, um eine entsprechende Gerade zu erhalten. Aus dem Ordinatenschnittpunkt kann man die Gesamtkonzentration der Antikörper berechnen, die wiederum für die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante aus der Steigung benötigt wird.

Der LANGMUIR-Plot führt zwanglos zur MICHAELIS-MENTEN-analogen Bestimmung der Affinitätskonstante, denn aus Gleichung 18 folgt:

$$[YA] = x = \frac{K[A][Y]_0}{1 + K[A]} \quad (\text{Gl. 20})$$

Die MICHAELIS-MENTEN-Gleichung in der üblichen Form [220] lautet:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Gl. 21})$$

Aus Gleichung 20 erhält man:

$$[YA] = \frac{[Y]_0[A]}{\left(\frac{1}{K}\right) + [A]} \quad (\text{Gl. 22})$$

Hier ist zu bemerken, daß  $K_M$  in der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung die Einheit [mol/L] besitzt und damit nicht  $K$ , sondern  $1/K$  analog ist.

Am Punkt der halben Sättigung gilt  $[YA] = [Y]_0/2$  und somit folgt aus Gleichung 20:

$$\frac{[Y]_0}{2} = \frac{K[Y]_0[A]_{50\%}}{1 + K[A]_{50\%}} \quad (\text{Gl. 23})$$

Daraus folgt nach kurzem Umformen:

$$K = \frac{1}{[A]_{50\%}} \quad (\text{Gl. 24})$$

In [221] wurde dieser Zusammenhang durch Annahme einer unnötigen Randbedingung erhalten. Es muß jedoch erwähnt werden, daß zur Ermittlung einer Affinitätskonstante die Konzentration des Tracers genau bekannt sein muß. Sonst ist nur ein "Ranking" der Affinitäten möglich.

Trotz dieser positiven Eigenschaften ist die Kritik über die, teilweise unsachgemäße Anwendung von SCATCHARD- und ähnlichen Plots nicht verstummt [216][222]. Die Kritikpunkte sind zahlreich:

Für polyklonale Antikörper ergibt sich sehr häufig eine Kurve, die nur mit Mühe interpretierbar ist. Es wird oft eine sog. mittlere intrinsische Affinitätskonstante definiert, die jedoch für die Praxis des ELISAs kaum relevant ist.

Es gibt unzählige Fälle, bei denen gekrümmte SCATCHARD-Plots zur Berechnung verschiedener Antikörper-Fractionen herangezogen wurden, meist einer hochaffinen und einer niedrigaffinen Fraktion. Die Berechnung von mehreren Steigungen aus einem Plot führt zu Werten, die keine Bedeutung haben, da die "SCATCHARD-Funktion" gemischter Antikörper ziemlich komplex ist.

Eine Krümmung des Plots kann zwei Ursachen haben: Negative Kooperation (die Bindung wird immer schwieriger, je mehr Ligand schon gebunden ist) und Heterogenität der Bindungsstellen, was bei polyklonalen Antikörpern naheliegt. Es läßt sich jeweils die andere Alternative nicht ausschließen.

Die Fehler in einem SCATCHARD-Plot sind in extremem Maße heteroskedastisch. Hieraus ergibt sich zwangsläufig, daß lineare Regressionen ohne Gewichtungen unzulässig sind. Zudem sind die Fehler in einer solchen Art verzerrt, daß grob falsche Schlüsse über die Größe bzw. der Verteilung in Abhängigkeit von der unabhängigen Variable nahegelegt werden.

Um die Konzentration der Bindungsstellen zu messen, muß grundsätzlich Sättigung erreicht werden. Aus SCATCHARD-Plots ist nicht ersichtlich, ob Sättigung erreicht wurde oder nicht. Eine Extrapolation ohne andersartige Überprüfung kann zu völlig falschen Werten führen.

Die Kritik an Verfahren mit radiogelabelten Liganden ist nicht weniger schwerwiegend:

Die Trennung von freiem und gebundenem Hapten [223] durch Zugabe von Reagenzien führt zu einer starken Störung des Gleichgewichts. Da die Dissoziation oft sehr schnell abläuft, führen Trennungspeduren, die größenordnungsmäßig eine Stunde dauern, zu stark verfälschten Werten. Es konnte gezeigt werden (SEPPÄLÄ [224]), daß nicht das ursprüngliche Gleichgewicht, sondern eher das im neuen Medium gemessen wird.

Diese Tatsachen sind oftmals nicht bekannt und führen dazu, daß Verdünnungskorrekturen für zugesetzte Reagenzien nicht durchgeführt werden.

Die veränderten Bindungseigenschaften durch zugesetzte (konzentrierte) Reagenzien (Änderung der Dielektrizitätskonstante usw.) können kaum berechnet und daher auch nicht sinnvoll korrigiert werden.

Da die spezifischen Aktivitäten von Tritium- oder  $^{14}\text{C}$ -gelabelten Substanzen verhältnismäßig niedrig sind, gibt es Probleme mit der Nachweisgrenze. Man muß zwangsläufig hohe Konzentrationen des häufig kostbaren Antikörpers verwenden.

Eine Messung ist nur möglich, wenn radioaktiv markierte Derivate zugänglich sind. Es ist also kaum realisierbar z.B. eine homologe Reihe durchzumessen, da die radioaktiven Substanzen fehlen. Eine Messung einer Affinitätskonstante wird so eine teure und aufwendige Angelegenheit, auf die oft verzichtet wird.

Der Umgang mit radioaktivem Material ist gesetzlichen Beschränkungen unterworfen. Viele Labors, die nicht die notwendigen Umgangsgenehmigungen vorweisen können, sind von der Anwendung dieses Verfahrens ausgeschlossen.

Zur zweiten Klasse (siehe S. 37) der Einteilung nach KLOTZ [216] gehören Methoden, die z.B. mittels Fluoreszenzspektroskopie, ESR, NMR oder Absorptionsmessungen Veränderungen des Liganden messen. Im einfachsten Fall geht man von zwei unterschiedlichen Umgebungen aus: In freier Lösung und gebunden an der Antikörperbindungsstelle. Diese Methode ist sehr wirksam, wenn bestimmte Korrekturen durchgeführt werden und eine wichtige Voraussetzung gegeben ist: Der Ligand muß bei der betreffenden Konzentration mit der gewählten Methode meßbar sein. Dies ist kein triviales Statement, da in vielen Fällen die einzusetzenden Konzentrationen zu niedrig sind. Es dürfte insbesondere bei hohen Affinitätskonstanten Probleme geben.

In die dritte Klasse werden alle Verfahren eingeordnet, die Veränderungen des Antikörpers verfolgen. Hierunter fallen u.a. auch Fluoreszenzmessungen von aromatischen Aminosäuren und NMR, sowie thermodynamische Untersuchungen z.B. des osmotischen Drucks. Hier tritt wie bei der zweiten Klasse das Problem auf, daß individuelle Eigenschaften des Antikörpers entscheiden, ob er für eine entsprechende Messung in Frage kommt. Auch die Empfindlichkeit der Messung ist kritisch. Im Zweifelsfall benötigt man sehr viel Antikörper, nur um einen einzigen Wert zu messen.

Aus dem Angebot eines Anbieters von Immunchemikalien [225] wurden Affinitätskonstanten von monoklonalen Antikörpern entnommen, um einen Eindruck der Größenordnungen zu vermitteln (Tabelle 5). Die Konstanten wurden mit Hilfe von  $^{125}\text{I}$ -markierten Derivaten und SCATCHARD-Plots erhalten. Daher ist Vorsicht bei der Interpretation angebracht: Es handelt sich wohl fast immer um die Affinitätskonstante des Iod-Tracers und nicht des Analyten selbst.

**Tabelle 5: Beispiele für Affinitätskonstanten von monoklonalen Antikörpern.**

Analyt	Molmasse $M_r$	Affinitätskonstante K [L/mol]
Cortisol	362.5	$1 \cdot 10^9$
Cortisol	362.5	$2 \cdot 10^7$
Digoxin	780.9	$1 \cdot 10^9$
Digoxin	780.9	$2 \cdot 10^9$
Digoxin	780.9	$2.5 \cdot 10^9$
Östradiol	272.4	$1.3 \cdot 10^{10}$
Östradiol	272.4	$1 \cdot 10^{10}$
Testosteron	288.4	$4 \cdot 10^9$
Testosteron	288.4	$3 \cdot 10^9$
Testosteron	288.4	$5 \cdot 10^{10}$
Testosteron	288.4	$5 \cdot 10^{10}$
Theophyllin	180.2	$3 \cdot 10^8$
Thyroxin (T4)	888.9	$1 \cdot 10^{10}$

Ein Schritt in die richtige Richtung ist die Methode von MÜLLER [226], die von Inhibitionskurven von ungelabelten Substanzen ausgeht. In der vorgestellten Form sind jedoch erhebliche Einschränkungen vorhanden: So gilt die Herleitung nur für den Fall, daß sich Analyt und Tracer identisch verhalten. Diese Methode ist daher nur mit Tritium-markierten Tracern hoher spezifischer Aktivität durchführbar. Zudem muß die absolute Tracerkonzentration genau bekannt sein, die bei heterogenen Präparaten ziemlich schwierig zu ermitteln ist.

FRIGUET et al. [227] haben eine ELISA-Methode zur Bestimmung von Antigen/Antikörper-Affinitätskonstanten vorgestellt. Es werden variierende Konzentrationen Antigen mit Antikörper versetzt und bis zum Gleichgewicht inkubiert, dann wird die Konzentration der freien Antikörper in einem indirekten Immunoassay bestimmt. Es wird quasi eine Vorinkubation vorgenommen (sequential incubation). Anschließend wird die Gleichgewichtsmischung in eine haptenbeschichtete Platte pipettiert. Durch diese Nachinkubation wird jedoch das ursprüngliche Gleichgewicht gestört. Es hängt von der (unbekannten) Dissoziationskonstante des zu vermessenden Antikörpers und den Konzentrationsverhältnissen ab, wie groß diese Störung ausfällt. Der an die Platte gebundene Antikörper wird mit Hilfe eines gelabelten Antikörpers quantifiziert. Die Autoren unterstreichen trotzdem, "wahre"

Gleichgewichtskonstanten zu messen, im Gegensatz zu den vollständig heterogenen Assays, die prinzipiell "scheinbare" Konstanten liefern. Bei Hapten-Immunoassays mit ihren oft in Sekundenbruchteilen eingestellten Gleichgewichten ist eine solche Methode mit vielen Fragezeichen zu versehen.

STEVENS [228] zeigte, daß bei der von FRIGUET et al. [227] vorgestellten Methode Korrekturen für bivalente Antikörper notwendig sind. Da die in der vorliegenden Arbeit erläuterte Methode für Haptene (monovalent) vorgesehen ist und kein Grund zu erkennen ist, wieso hier eine Wechselwirkung zwischen zwei Bindungsstellen vorhanden sein soll, läuft diese Kritik in diesem Fall ins Leere.

Eine wirkliche Limitierung liegt in der Tatsache verborgen, daß die Konkurrenzreaktion in der Nähe einer Festphasenoberfläche abläuft. Sollten Polarisierungsvorgänge, Anreicherungseffekte o.ä. auftreten, so können verfälschte Werte im Bezug auf die thermodynamische Gleichgewichtskonstante in Lösung resultieren. "Richtig" ist der erhaltene Wert im Bezug auf ELISA-Anwendungen. Es wurden jedoch in dieser Arbeit keine Indizien für derartige Abweichungen gefunden. Sollten sie auftreten, so könnte man das gezeigte Verfahren zu einer pseudo-homogenen Variante umbauen und damit diese Probleme umgehen. Dieser pseudo-homogene Test ist dem Vorschlag von FRIGUET überlegen, da nicht nur die schwach und schnell bindenden Analyten vorinkubiert werden, sondern auch der fast beliebig langsame Tracer. Hier sind viel eher die Möglichkeiten gegeben, durch einen Fangantikörper eine schnelle Immobilisierung durchzuführen und somit das Gleichgewicht für eine ausreichende Zeit "einzufrieren".

HOGG et al. [229] verwendeten einen indirekten ELISA zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante von Paraquat. Dennoch erscheint die mathematische Herleitung mit vielen unsicheren Randbedingungen behaftet, so daß die erhaltenen Gleichgewichtskonstanten nicht direkt nachvollziehbar sicher sind. Zudem könnte es mit multivalenten Antikörpern (IgG, IgM) Probleme geben. Da die Herstellung von  $F_{ab}$ -Fragmenten aufwendig ist, ist die Anwendungsbreite ziemlich eingeschränkt.

Gleichfalls eine indirekte ELISA-Variante haben NIETO et al. [230] vorgeschlagen, um die Affinitätsverteilung von polyklonalen Antikörpern zu messen. Die Methode geht von einer Verdünnungsreihe des immobilisierten Haptens aus. Die primäre Idee basiert auf der Beobachtung, daß bei sehr geringen immobilisierten Antigenmengen nur die Antikörper mit der höchsten Affinität gebunden werden. Entsprechend kann man durch Erhöhung der Konzentration immer mehr Antikörperfraktionen einbeziehen. Der Grenzfall der geringen Antigenkonzentration erscheint durchaus interessant und deckt sich mit der Beobachtung von WEILER [231], daß polyklonale Seren bei hohen Verdünnungen "pseudo-monoklonales" Verhalten zeigen. Für kompetitive Immunoassays, deren Empfindlichkeit bei  $[Y] \rightarrow 0$  maximal wird, ist jedoch Information über die "schlechteren" Fraktionen von geringerem praktischen Nutzen.

Die in dieser Arbeit weiterentwickelte Methode, über ELISA-Eichkurven Affinitätskonstanten zu messen, gehört auch in diese Gruppe. Hier wird die Veränderung der Antikörper gemessen, ihre Funktion "Tracerbindung" ausüben zu können, was bei einem gebundenen Hapten nicht mehr möglich ist. Im weitesten Sinn könnte man dies als Beobachtung der "biologischen Aktivität" des Antikörpers einstufen.

Dieses ELISA-Verfahren ("50%-Verfahren") weist einige entscheidende Vorteile auf:

1. Die Antikörpermenge, die verbraucht wird, ist extrem gering.
2. Der Antikörper braucht nicht chemisch rein vorzuliegen.
3. Es ist nicht notwendig, die Antikörperkonzentration zu bestimmen.
4. Es ist nicht notwendig, die Tracerkonzentration zu bestimmen.
5. Es ist weitgehend jeder Antikörper ausreichender Affinität geeignet.
6. Das Verfahren ist extrem schnell und billig.
7. Durch zahlreiche Replikate ist die statistische Sicherheit hoch.
8. Das Verfahren gibt auch für polyklonale Antikörper sinnvolle Werte.
9. Die Auswertung ist direkt und einfach.

## 1.6 Diffusion

Abgesehen von Abb. 106 werden in dieser Arbeit keine Messungen zur Diffusion vorgestellt. Da die Grenzfälle Reaktions- oder Diffusionslimitierung häufig kontrovers diskutiert werden, soll zumindest eine kurze Übersicht gegeben werden.

NAYAK [232] hat 1981 das Thema der Reaktionskinetik bei heterogenen Immunoassays behandelt und hierbei besonders unterschiedliche Geometrien untersucht. Es wurde gefolgert, daß bei Immunoassays diffusionslimitierte Prozesse auftreten können.

Einige Publikationen von STENBERG und NYGREN widmen sich fast ausschließlich dem Problem des Massentransports bei Immunoassays [233][234].

STENBERG und STIBLERT [235] haben das Problem mathematisch gründlich durchleuchtet und geben Formeln für kugelförmige Carrier-Oberflächen, die im Grenzfall  $r \rightarrow \infty$  in den Fall einer planen Platte übergehen. Sie zeigen, daß bei Immunoassays mit immobilisiertem Antigen die Bindung von Antikörpern je nach Bedingungen einmal diffusions- und einmal reaktionslimitiert sein kann. Dies bedeutet, daß keine allgemeine Aussage möglich ist.



Es wird aber ausführlich diskutiert, welche Faktoren eine Diffusionslimitierung begünstigen:

- Carrier in Form einer Platte
- kleiner Diffusionskoeffizient (großes Molekül, hohe Viskosität)
- hohe Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
- hohe Konzentration an immobilisiertem Reagenz
- niedrige Sättigung (z. B. Anfang der Reaktion)

Dies könnte bedeuten, daß z.B. der Tracer diffusionslimitiert ist, der kleine Analyt aber nicht (Diffusionskonstante). Eine diffusionslimitierte Reaktion geht bei zunehmender Sättigung in ein reaktionslimitiertes Regime über. Bei niedrigen Coating-Konzentrationen sollte man eher eine Reaktionslimitierung erwarten. Die Messungen der Reaktionsordnung bezüglich Antikörper und Tracer (siehe S. 95) zeigen jedoch keine Anzeichen einer Diffusionslimitierung. Man kann daraus schließen, daß zumindest die meisten hier vorgestellten ELISAs bezüglich des Tracers reaktionslimitiert sind. Entscheidende Diffusionseinflüsse könnten bei der Bindung des Analyten vorherrschen. Dies könnte durch den Vergleich von üblichen und pseudohomogenen ELISAs geklärt werden.

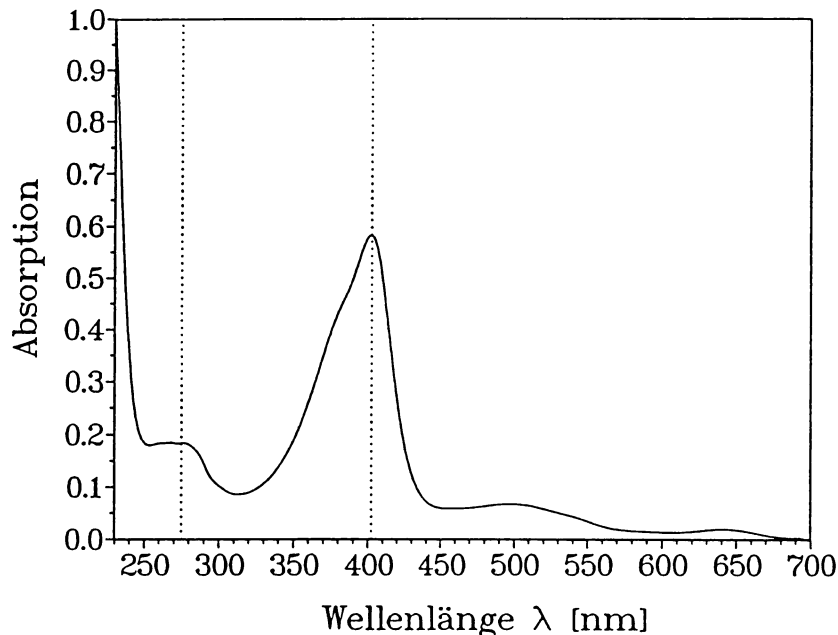
### 1.7 Konzentrationsmessungen

Konzentrationsmessungen von Antikörpern und Tracern sind absolut nicht trivial. An der ungenauen Bestimmung dieser Konzentrationen können Messungen von kinetischen Konstanten scheitern.

Zur Bestimmung von Protein existieren eine größere Anzahl verschiedener Methoden, die sich jedoch dadurch auszeichnen, daß sie für genaue Messungen mit dem jeweiligen Protein geeicht werden müssen. Wenn man dieses Protein nur in unreiner Form und unbekannter Konzentration in einer Lösung vorliegen hat, sind diese Methoden weitgehend am Ende. Für Antikörper und Enzyme kommt primär eine "Funktionsbestimmung" in Frage. Antikörper können mit einem Liganden "titriert" werden, wobei die extrem niedrigen Konzentrationen dieses Unterfangen leicht vereiteln können. Monoklonale Antikörper können affinitätschromatographisch bis zur Homogenität gereinigt werden, wobei aber genügende Mengen vorliegen müssen. Anschließend kann entweder über eine Gefriertrocknung (Lyophilisierung) die Konzentration gravimetrisch bestimmt werden, oder man führt einen Protein-Test durch. Fraglich ist jedoch immer, ob die entsprechende Konzentration der Konzentration der funktionellen Proteine entspricht, oder ob größere Anteile denaturierten Proteins vorhanden sind.

Für Peroxidase-Tracer bieten sich zwei Verfahren an. Das erste bezieht sich auf die Absorptionsbande (403 nm) des Häm-Proteins, die als Soret-Bande bezeichnet wird. Die sog. Reinheitszahl (RZ) kommerzieller Peroxidase-Präparationen nutzt diese Absorption zur

Bestimmung des Peroxidase-Gehalts aus und ist als Quotient der Absorptionen bei 403 nm und 275 nm definiert.



**Abb. 9:** Typisches Absorptionsspektrum einer Meerrettich-Peroxidase.  $RZ = A_{403}/A_{275} = 3.23$ , (Boehringer Nr. 814 407).  $c = 5.7 \mu\text{M} = 0.25 \text{ g/L}$  in PBS.

Hier ist nicht von Aktivität die Rede, eine hohe Reinheitszahl kann (z.B. nach spezifischer Hemmung) mit einer niedrigen Enzym-Aktivität verbunden sein. Damit ist schon die zweite Methode angesprochen. Enzymaktivitäten zu messen ist meist kein großes Problem. Man kann sich einen der zahlreichen "Standard"-Assays aussuchen und eine Aktivität ausrechnen. Leider werden Aktivitäten in "units" ausgedrückt, die mit den molaren Konzentrationen des Enzyms auf eine meist unbekannte Weise zusammenhängen. Enzyme kann man also über die Aktivität gut vergleichen - eine absolute Konzentration erhält man jedoch nur in Ausnahmefällen. An der molaren Konzentration ist man mit der Soret-Bande viel näher, molare Absorptionskoeffizienten wurden mehrfach publiziert (siehe S. 15). Keines dieser Verfahren kann jedoch underivatisierte Peroxidase von derivatisierter unterscheiden. Sollten also noch ungekoppelte Anteile von Peroxidase übriggeblieben sein, so wird die Tracerkonzentration systematisch überschätzt. Dies kann zumindest minimiert werden, indem bei Kopplungsprozeduren extreme Überschüsse an Reagenz eingesetzt werden. Man kann dann einigermaßen sicher sein, daß alle zugänglichen Aminogruppen quantitativ abreagiert haben.

## 1.8 Adsorptionseffekte

Immunoassays haben oft mit unspezifischen Bindungen zu kämpfen. Insbesondere indirekte ELISAs sind hier anfällig. Daher sind allerlei Blocking-Mittel in Gebrauch, so Rinder-serumalbumin, entfettete Trockenmilch, Casein, Ovalbumin, Gelatine, Eiweißhydrolysate und

vieles mehr [236][237]. Trotz der Vielzahl an Zusätzen scheint das Problem nicht endgültig gelöst zu sein. Unspezifische Adsorption kann durch ein geschicktes Testdesign und durch die Wahl angemessener Tracerkonzentrationen weitgehend unterdrückt werden. Bei der in dieser Arbeit üblicherweise verwendeten Konfiguration treten kaum Probleme mit unspezifischer Adsorption auf. Der Anteil des unspezifisch gebundenen Tracers ist meist sehr gering.

In einem anderen Zusammenhang sind Adsorptionseffekte von Interesse: Will man regenerierbare Immunosensoren bauen, so muß man den gebundenen Tracer unter milden Bedingungen wieder ablösen können. Dies ist bisher nur sehr unvollständig gelungen. Reversible ELISAs sind also ein Ziel, das durch mechanistische Untersuchungen erreicht werden könnte. Ohne genauere Kenntnis der Wechselwirkungen, die beim ELISA eine Rolle spielen, wird hier wohl kein Durchbruch erzielt werden können.

## 1.9 Temperatureffekte

Der Vollständigkeit halber soll hier auch auf die Temperaturabhängigkeit von Immunoassays kurz eingegangen werden. Der Temperaturkoeffizient von Enzymen läßt sich leicht bestimmen und ist relativ hoch [238]. Randeffekte in Mikrotiterplatten können weitgehend auf diesen Effekt zurückgeführt werden [239][240]. Interessanter ist jedoch die Frage, ob es Temperatureinflüsse auf die Antigen-Antikörper-Reaktion gibt. Dies ist in unserem Labor besonders relevant geworden, als während einer Hitze-Periode im Sommer einige Immunoassays erhebliche Einbußen hinsichtlich Nachweisgrenze und Signalhöhe zeigten [241]. Die Literatur gibt hier keine entscheidenden Hinweise: In verschiedenen Arbeiten wurden Immunoassays thermodynamisch unter die Lupe genommen. Als Resümee konnte festgestellt werden, daß gerade Hapten-Immunoassays keine oder nur sehr geringe Temperaturabhängigkeiten zeigten [242]. Dies bezieht sich jedoch nur auf die Gleichgewichtskonstante, im Bereich der Kinetik dürfte das etwas anders aussehen.

## 2 Strukturelle Aspekte

### 2.1 Allgemeines

Es dürfte eigentlich nicht überraschen, daß Immunoassays sehr viel mit räumlichen Strukturen zu tun haben. Trotzdem wird oft so gehandelt, als ob das Immunsystem chemische Strukturformeln lesen könnte. Zwei Verbindungen, die für den Chemiker sehr ähnlich sind, können sich im räumlich-strukturellen Charakter stark unterscheiden. Hydrophile oder hydrophobe Reste, aromatische Systeme, Polarität, Polarisierbarkeit, Partialladungen, intramolekulare Wechselwirkungen usw., dies alles "sieht" ein Antikörper. Daher ist es wichtig, dem Prinzip Antikörperbindung alles andere unterzuordnen.

Da der Antikörper das eigentlich selektive Element in einem Immunoassay darstellt, muß jeder Abstrich, der im Bezug auf den Antikörper gemacht wird, mit erheblichen Qualitätseinbußen bezahlt werden. Von einem rein zielgerichteten Standpunkt aus gesehen ist es ziemlich klar, wie ein idealer Antikörper auszusehen hat: Extrem hohe Affinitätskonstante, hohe Selektivität und große Robustheit. Zumindest die ersten beiden Punkte sind nur vorstellbar, wenn eine optimale Paßform zwischen Analyt und Antikörper vorhanden ist. Das große Problem ist nur: Wie macht man dem Immunsystem klar, welchen Antikörper man haben will? Diese Frage mag für den einen oder anderen im ersten Moment trivial klingen, es handelt sich aber hier um eine der Kernfragen für die Entwicklung von Immunoassays. Momentan muß noch alles über eine Immunisierung laufen. Dies wiederum zeichnet die Strategie eindeutig vor: Das Immunogen ist die Information, die Botschaft an das Immunsystem. Wenn die Botschaft falsch oder mißverständlich formuliert wird, kommt ein falsches Ergebnis heraus: Nicht für das Immunsystem, aber für den Entwickler eines Immunoassays.

Trotz langjähriger Forschungen sind von der Sprache des Immunsystems nur Fragmente bekannt. Niemand weiß genau, wie die Selektion und Stimulation von Immunzellen funktioniert. Zugegebenermaßen hat die Entwicklung von Immunoassays auch funktioniert, ohne daß komplizierte strukturelle Regeln beachtet worden wären. Schaut man dann die Ergebnisse genauer an, so sehen sie eher kläglich aus: Ein Antikörper, der Pestizide im mittleren  $\mu\text{g/L}$ -Bereich detektieren kann, ist jederzeit erhältlich. Will man aber 3 Zehnerpotenzen oder mehr zu niedrigeren Konzentrationen vorstoßen, so reicht das Vertrauen auf den Zufall nicht mehr aus.

## 2.2 "Spacer Recognition"

Die wenigen Kenntnisse, die sich auf dem Gebiet der "Strukturellen Immunologie" angesammelt haben, konzentrieren sich auf ein paar Faustregeln. Eine besonders häufige Regel bezieht sich auf die Vermeidung von sog. Brückenantikörpern [231][243]. Im englischen Sprachraum als "Spacer Recognition", "Bridging Group Recognition", "Handle Recognition" oder "Bridge Binding" bezeichnet, kursieren verschiedenste Rezepte, diesen Effekt zu umgehen. Es handelt sich um die Beobachtung, daß Haptene, die zur besseren Präsentation mit einem Spacer (Abstandshalter) versehen wurden, zwar gut bindende Antikörper ergeben, daß aber das Derivat mit Spacer wesentlich besser gebunden wird, als der Analyt. Es wird nun postuliert [244], daß es Antikörper gäbe, die zwar den Spacer stark binden, nicht jedoch das Hapten. Wird nun zur Tracersynthese das identische Spacerderivat verwendet, so bindet dieser Tracer stark an den sog. Brückenantikörpern. Er ergibt aber keine Eichkurve, da er vom Analyten nicht "verdrängt" werden kann. Spacer Recognition wird meistens dann angenommen, wenn gut bindende Tracer keine oder nur sehr unempfindliche Eichkurven ergeben. Bei Spacer Recognition wird meist nicht deutlich unterschieden, ob nur eine verstärkte Bindung des Tracers bei mäßiger Bindung des Analyten gemeint ist, oder eine starke Tracerbindung, die auch nicht durch hohe Analytkonzentrationen inhibiert wird. Es

gibt eine eindeutige Abgrenzung zwischen diesen Fällen, da im ersteren Fall nur eine Antikörpersorte im letzteren aber mehrere beteiligt sind (siehe S. 65).

Der einfachste, aber wahrscheinlich schlechteste Weg Spacer Recognition zu vermeiden, kann darin liegen, überhaupt keinen Spacer für die Immunisierung zu verwenden. Es wird gelegentlich auch empfohlen, nur kurze Spacer anzubringen.

Eine sehr begrenzt anwendbare Methode ist der Austausch von Antikörpern durch natürliche Bindungsproteine [245]. Da diese nicht durch Immunisierung gewonnen werden, zeigen sie auch logischerweise keine Spacer Recognition. Der Thyroxin-Test von EKINS (1960) [19] basierte auf einem solchen Bindungsprotein.

In einer neueren Arbeit [246] wird sogar behauptet, möglichst unpolare Alkylketten als Spacer würden Spacer Recognition minimieren, was angesichts der vorwiegend hydrophoben Wechselwirkungen im Antigen/Antikörper-Bereich nicht sehr wahrscheinlich ist.

SAUER et al. propagieren eine Kombination, die für das Immunogen einen Hemisuccinat-Spacer und ein Glucuronid für den Tracer vorsieht. Es wird postuliert, daß der große sterische Anspruch des Glucuronids eine Spacer Recognition weitgehend unterbinden würde. Gegen diese Annahme sprechen eindeutig die publizierten Daten [247]. So dürfte es mehr als ein Zufall sein, daß unter den ca. 50 untersuchten Enzymtracer-Varianten fast immer der Tracer mit dem niedrigsten Signal ( $B_0$ ) die höchste Empfindlichkeit ergibt. Und dies hängt offensichtlich nicht nur von der Art des verwendeten Spacers ab.

### 2.3 Homologe und heterologe Tests

Homolog und heterolog darf in diesem Zusammenhang nicht mit homogen und heterogen verwechselt werden. Bei homologen Tests ist das Hapten des Tracers (oder das immobilisierte Hapten) identisch mit dem Hapten des Immunogens. Bei heterologen Tests sind die Haptene (strukturell) unterschiedlich. Der Zweck eines heterologen Tests ist die Unterdrückung von sog. Brückenantikörpern, die den Spacer stark, nicht jedoch den Analyten binden sollen. Durch Brückenantikörper wird die Sensitivität und Selektivität eines Immunoassays negativ beeinflusst.

Es werden mehrere Typen der Heterologie unterschieden: Brücken-, Stellungs- und Haptenheterologie<sup>9</sup>. Beim ersteren Typ ist nur der Spacer unterschiedlich, beim zweiten ist die Anbindungsstelle des Spacers variiert und beim dritten Typ ist der Kernbereich des Haptens selbst verändert. Nach den ersten Publikationen von VAN WEEMEN und SCHUURS [25] [248] wurden unzählige Arbeiten veröffentlicht, bei denen Verbesserungen der Sensitivität und der Selektivität durch heterologe Kombinationen sowohl bei RIAs als auch

---

<sup>9</sup> Wörtlich: bridge, site and hapten heterology.

bei ELISAs erzielt worden sind [249]-[252]. Es wurden auch Berichte veröffentlicht [253], daß bei dem Versuch, heterologe  $^{125}\text{I}$ -Tracer herzustellen, sechs "nicht"-bindende Derivate erhalten wurden. Nur der homologe Tracer zeigte ein gutes Bindungsverhalten. Der Test war zwar relativ unempfindlich, konnte aber durch eine sequentielle Inkubationsmethode stark verbessert werden. Interessanterweise gibt es viele homologe Tests, die hervorragende Eigenschaften aufweisen [99][254]. Schon 1974 wurden Zweifel an der Richtigkeit der "Brückenantikörper"-Theorie geäußert [255]. Diese Kontroverse hat dazu geführt, daß in dieser Arbeit umfangreiche Studien zu diesem Themenkreis angestellt wurden.

VAN WEEMEN und SCHUURS haben in einer grundlegenden Arbeit [248] alle drei oben genannten Typen der Heterologie sowie Kombinationen derselben getestet. Sie verwendeten Östrogen-Enzymimmunoassays für ihre Untersuchungen. In fast jedem Fall waren die heterologen Kombinationen erheblich empfindlicher (Faktor > 100), jedoch wurde oft auch mehr Antiserum gebraucht. Die Autoren interpretierten die Befunde durch einen Unterschied der Affinitäten von Tracer und Analyt. Durch heterologe Kombinationen wird der Unterschied ausgeglichen; somit erhält man eine bessere Konkurrenz. Zudem wurde gefunden, daß insbesondere Stellungsheterologie zu veränderten Kreuzreaktionen führt, was auf andere Antikörperpopulationen hinweist. Es soll hier betont werden, daß sämtliche Enzymtracer in praktisch identischen Konzentrationen (Enzymaktivität) eingesetzt wurden.

Ähnliche Ergebnisse erhielten FUJIWARA et al. [256], die auch gleiche Enzymaktivitäten für homologe und heterologe Tests einsetzten. PIRAN et al. [257] führten sogar Gleichgewichtssimulationen durch und fanden deutliche Verbesserungen sowohl bei polyklonalen als auch bei monoklonalen Antikörpern. In der Arbeit von PIRAN et al. ist aber deutlich zu erkennen, daß homologe Assays bei gleicher Tracerkonzentration höhere Signale ergeben (stärkere Bindung).

Um homologe Tests zu verbessern, wurde versucht, Spacer zu finden, die schwach immunogen sind. Es wurden insbesondere Zuckerderivate (Glucuronide) empfohlen. Sehr überzeugend sind die Ergebnisse jedoch nicht. Der postulierte Unterschied in den Eichkurven von CORRIE et al. [258] scheint eher auf die unterschiedliche Tracerkonzentration<sup>10</sup> zurückzuführen zu sein, als auf eine besonders schwache Spacerbindung.

TIEFENAUER und ANDRES [259] folgerten aus einem Vergleich zwischen  $^3\text{H}$ - und  $^{125}\text{I}$ -markiertem Melatonin, ein fehlender Spacer könnte Bridge Recognition unterdrücken. In diesen Arbeiten wird weniger der Testmittelpunkt, als die Steigung als Indiz für Bridge Recognition verwendet. Für den  $^{125}\text{I}$ -Test wurden wesentlich geringere Tracer- (ca. Faktor 15) und Antikörper-Konzentrationen (Faktor 25) eingesetzt. Somit ist eine Verbesserung der Empfindlichkeit um den Faktor 8 völlig im Rahmen des Erwarteten. In einem Folgeartikel [260] wird gleichfalls die Wichtigkeit der Steigung herausgestellt. Hier zeigt sich, daß von verschiedenen Autoren unter Bridge Binding völlig unterschiedliche Phänomene verstanden

---

<sup>10</sup> Vergleiche zwischen 4000 und 6000 counts/min bzw. 4000 und 10.000 counts/min.

werden, die getrennt behandelt werden müssen. Im Diskussionsteil verschiedener Arbeiten hat man oft den Eindruck, daß "Bridge Binding" als Synonym für "schlechter Test" dient, ungeachtet der vielfältigen Ursachen im Detail.

#### 2.4 Schwach bindende Tracer

Einen sehr engen Zusammenhang mit heterologen Tests hat die Idee der sog. schwach bindenden Tracer. Ausgehend von einem Gleichgewichtsmodell läßt sich zeigen, daß unter bestimmten Voraussetzungen optimale Sensitivität erreicht werden kann, wenn Analyt und Tracer identische Affinitätskonstanten aufweisen. Diese Konstellation tritt jedoch in der Realität fast nie auf. Aus Gründen, die mit Spacer Recognition zu tun haben, bindet der Tracer oft wesentlich besser als der Analyt. Dies ist bei einer hohen Ähnlichkeit zwischen Immunogen und Tracer auch nicht verwunderlich. Aus den oben genannten Modellrechnungen wird nun geschlossen, daß stark bindende Tracer durch Verdrängung des Analyten von den Bindungsstellen einen schlechten Einfluß auf die Testsensitivität ausüben. Umgekehrt erhofft man sich Empfindlichkeitssteigerungen durch den Einsatz von schwächer bindenden (heterologen) Tracern. Auch dies wurde in der vorliegenden Arbeit einer Überprüfung unterzogen.

Die analoge Vorgehensweise bei indirekten ELISAs betrifft die Auswahl des immobilisierten Haptens. Es wird vermutet, daß schwächer bindende Haptene zu empfindlicheren Tests führen [198]. Auch diese Hypothese ist in ihrer allgemeinen Form anfechtbar, da sie auf einem Gleichgewichtszustand basiert, der in heterogenen Immunoassays kaum je erreicht wird. Zudem wird meist der Einfluß der Kopplungsdichte (Multivalenz) und der Coatingdichte ("Konzentration") nur unzureichend berücksichtigt.

#### 2.5 Spacerlänge

In Analogie zu den Experimenten von VALENTINE und GREEN [40], die bivalente 2,4-Dinitrophenylderivate eingesetzt hatten, sind detailliertere Untersuchungen veröffentlicht worden [261]. Es wurde gezeigt, daß auch kürzere, namentlich 1,3-Diaminopropan-Derivate eine signifikante Dimer-Bildung aufweisen können. Jedoch erst ab 1,6-Diaminohexanspacern erreichte die Oligomerbildung einen Maximalwert. Man muß hier betonen, daß die Immunisierung mit DNP-Gammaglobulin ohne jeglichen Spacer vorgenommen wurde. Da VALENTINE und GREEN besonders hochaffine Antikörper verwendet hatten, überrascht die Diskrepanz der Ergebnisse nicht. Man kann vermuten, daß die Tiefe der Bindungstasche in positiver Weise mit der Affinität der Antikörper zusammenhängt.

Abgesehen von den Überlegungen in Richtung Vermeidung von Spacer Recognition, werden fast durchgehend kurze bis mittlere Spacerlängen verwendet ( $C_2$  -  $C_6$ ). Längere Spacer werden vermieden, da ein "Umklappen" des Spacers befürchtet wird [262]. In einer Ar-

beit von COLBERT et al. [263] wird gezeigt, daß die Eichkurven eines Methylamphetamin-Immunoassays ( $M_r=149$ ) empfindlicher werden, wenn die Spacer-Länge des Fluorescein-Tracers verkürzt wird. Auch hier wird postuliert, daß die höhere Affinität der Tracer mit langem Spacer für die verringerte Sensitivität verantwortlich sei. Aus diesen und ähnlichen Experimenten leitet sich die Schlußfolgerung ab, schwach bindende Tracer führten zu besseren Empfindlichkeiten.

Dagegen zeigt eine Arbeit von TIEFENAUER und ANDRES [264] den sterischen Anspruch von Biotin-Östradiol-Derivaten. So sind 6- bis 7-atomige Spacer völlig ungeeignet, 13-atomige (flexible) zeigen gute, 14-atomige (starre) schlechte und 18-atomige (homologe) exzellente Bindungseigenschaften. Da in diesem Fall zwei Bindungsmoleküle beteiligt sind (Avidin und Antikörper), müssen die Werte ungefähr halbiert werden, um den Raumanpruch des Antikörpers zu erhalten. Trotzdem bleibt noch eine optimale Spacerlänge von mindestens 9 Atomen.

Genau gegensätzliche Folgerungen ziehen HOSODA et al. [265]. Die Autoren fanden eine Verbesserung der Sensitivität durch die Verwendung von verkürzten Spacern. Eine Verlängerung zeigte keinen positiven Einfluß. Es wird zwar betont, daß sogar eine Verdünnung des Antiserums keine Verbesserung der Empfindlichkeit bei langen Spacerderivaten erbracht hätte. Offensichtlich übersehen wurde, wie in vielen Arbeiten, daß hier nur die Verdünnung des Tracers effektiv ist und nicht durch eine Verdünnung des Antikörpers substituiert werden kann. Es wurden jedoch bei allen Experimenten gleiche Enzymtracer-Konzentrationen eingesetzt.

In einem Artikel von NORDBLOM et al. [266] wird die Problematik der Brücken-Antikörper übersichtlich dargestellt. Hier zeigt sich auch ein weit verbreitetes Mißverständnis: Es wird vermutet, daß durch die höhere Affinität des Tracers im Vergleich zum Analyten die Eichkurven flacher würden. Es kann jedoch leicht gezeigt werden (siehe auch Simulationen), daß dies nicht der Fall ist. Bei höheren Traceraffinitäten tritt eine Verschiebung des Testmittelpunkts auf, die Steigung bleibt aber konstant (unter normalen Bedingungen). Es wird also eindeutig eine falsche Ursache für ein bekanntes Phänomen genannt. Da die Basis des Brückenantikörper-Problems in dieser Form wahrscheinlich nicht existiert, sind auch alle Rezepte, die auf diesem Konzept fußen, mit erheblichen Fragezeichen zu versehen. In der Publikation von NORDBLOM et al. wird schon vermutet, daß die Tracerkonzentration ein wichtiger Parameter darstellen könnte, um die uneinheitlichen Ergebnisse verschiedener Autoren zu erklären.

KEUCHEL [267] zeigte am Beispiel eines TNT-Immunoassays, daß auch Antikörper, die mit spacerlosen Derivaten gewonnen wurden, Spacer für Enzymtracer benötigen können. Eine Verlängerung über die Mindestspacerlänge von 3 Kohlenstoffatomen hinaus erbrachte jedoch keine signifikante Veränderung mehr. Dies könnte ein Hinweis auf das bei einer Immunantwort ablaufende "Processing" sein, das zu einem partiellen Abbau des Immunogens führt. Auf diese Weise kann eine Verringerung der sterischen Hindernisse eintreten, was zur



Herstellung entsprechender Antikörper führt. Im Enzymkonjugat sind die sterischen Verhältnisse wieder ungünstiger, so daß ein Spacer positive Effekte zeigt.

## 2.6 Anbindungsstelle des Spacers

Eine wichtige Entscheidung bei der Auswahl des richtigen Haptens zur Immunisierung (oder für einen Tracer) ist das Festlegen der Anbindungsstelle. So lange man sich nicht von einer kovalenten Anbindung lösen kann, muß eine Stelle des Analyten gefunden werden, an der günstigerweise ein Spacer angebracht werden könnte. Diese Auswahl findet aber fast immer nach Kriterien der günstigsten Synthese statt [246], nicht unbedingt nach immunologischen Gesichtspunkten. Nur wenige Experimentatoren machten sich die Mühe einer detaillierten Diskussion unterschiedlicher Möglichkeiten [268]. Die Selektivität eines Antikörpers kann durch diese Auswahl entscheidend beeinflußt werden [269]. Die Sensitivität läßt sich wohl am ehesten an der Ähnlichkeit des Derivats zum Analyten festmachen [270].

## 2.7 Auswahl der immunogenen Struktur

Dieses Problem soll hier nur insofern angerissen werden, als es einer rationalen Beschreibung im Augenblick zugänglich ist. So werden nicht die Vorzüge und Nachteile verschiedener Carrier behandelt, da dieser Einfluß sich kaum sinnvoll interpretieren läßt und somit einer empirischen Behandlung vorbehalten bleibt. Wendet man sich aber der Hapten-Struktur im weitesten Sinne zu, so lassen sich durchaus Regeln formulieren, die eine sinnvolle Strategie ermöglichen. Stehen dem Experimentator Systeme zum Molecular Modelling zur Verfügung, so erscheint es sehr ratsam, diese intensiv zu nutzen, denn das Hapten soll in möglichst vielen Eigenschaften dem Analyten ähneln.

Da oft z.B. die räumlichen Verhältnisse in Molekülen falsch eingeschätzt werden, können computergestützte Methoden sehr wertvolle Hinweise geben. Doch auch mit "klassischen" Argumentationsketten lassen sich gültige Prognosen erstellen. Die folgenden (Faust-)Regeln sollen etwas differenzierter die Ähnlichkeit von Molekülen beschreiben. Aufgrund der großen Variabilität des Immunsystems haben diese Regeln auch im günstigsten Fall keine absolute Gültigkeit. Sie sollen nur helfen, mit größerer Wahrscheinlichkeit gute Antikörper zu erhalten.

**Regel 1:** *Die räumliche Struktur von Hapten und Analyt sollen sich möglichst wenig unterscheiden.*

Ein sehr instruktives Beispiel wurde von SCHLAEPPI et al. berichtet [188]. Die Autoren versuchten ausgehend vom Atrazin (I) zwei alternative Substitutionen: (III) Spacer als Verlängerung der Ethylgruppe und (II) Spacer an die Aminogruppe. Die reine "Massenbilanz" ist in diesen beiden Fällen identisch. Trotzdem war nur die erste Variante erfolgreich für die

Produktion von Atrazin-Antikörpern. Das Derivat (II) scheint für das Immunsystem relativ zu Atrazin unähnlich zu sein. Ursache könnte der dritte Substituent am Amin sein (Änderung der Bindungswinkel). Nachteile dieser Position sind auch eine Änderung der konformativen Beweglichkeit, sowie der Basizität. Es ist auch denkbar, daß der dritte Substituent durch sterische Probleme die Mesomerie des Stickstoffs mit dem Triazinring unterbricht. Möglicherweise sind die Kohlenstoffsubstituenten des Atrazins durch Mesomerie koplanar zum Ring, was durch den weiteren Substituenten partiell verhindert worden ist. Auch bestimmte tautomere Strukturen werden durch die Substitution am Stickstoff unmöglich gemacht. Die Derivatisierung am Heteroatom erscheint wesentlich schlechter geeignet, als die am Kohlenstoff (siehe Regel 8).

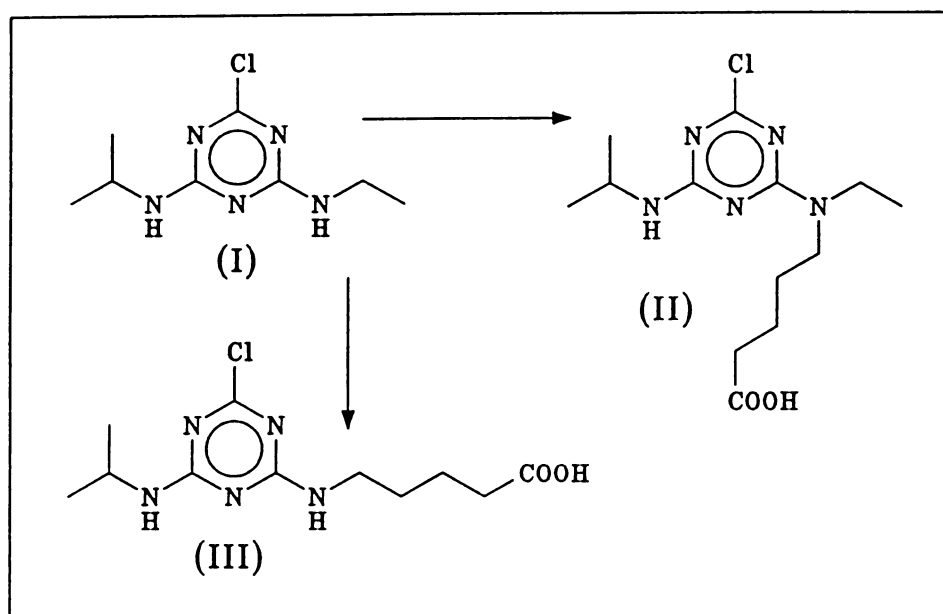


Abb. 10: Unterschiedliche Haptene zur Gewinnung von Atrazin-Antikörpern. Nur Konjugate mit Hapten (III) ergaben Atrazin-bindende Antikörper.

Es kann extrapoliert werden, daß bei Derivatisierungen  $sp^2$ -hybridisierte Atome keinesfalls durch  $sp^3$ -hybridisierte ersetzt werden sollten oder umgekehrt. Atome, die eine Schlüssel-funktion in der Struktur des Moleküls haben, sind für Kopplungen nicht geeignet. So können neue Substituenten die bevorzugte Konformation eines Stammoleküls energetisch begünstigen oder destabilisieren. Im Bereich der Steroide gibt es zahlreiche Untersuchungen, die die Wichtigkeit der Erhaltung der Stereochemie unterstreichen [271].

**Regel 2:** *Der Ladungszustand des Haptens und des Analyten müssen bei physiologischem pH-Wert identisch sein.*

Gegen diese Regel wird oft verstoßen und somit sind auch schöne Beispiele aus der Literatur vorhanden. Der vielleicht bekannteste Assay mit dieser Schwäche ist der Gibberellinsäure-RIA von WEILER [272]. Hier wurde die in Handbüchern oft empfohlene Methode angewendet, eine im Analyten (I) vorhandene Carboxylat-Funktion zur Kopplung an ein Protein zu verwenden (Abb. 11). Mit dieser Reaktion wird das negative Carboxylat in ein neutrales

Amid (II) verwandelt, d.h. eine Ladung geht verloren. Es wurde erwartungsgemäß gefunden, daß die Bindung der Gibberellinsäure bei niedrigem pH-Wert stärker wird. Dies wird durch die Protonierung des Carboxylats verursacht. Die ungeladene Carbonsäure ähnelt dem Immunogen mehr als das Carboxylat-Anion. Der ungeladene Methylester (III) wird über 100fach empfindlicher detektiert als die Gibberellinsäure. Das Problem wurde in der genannten Arbeit so gelöst, daß alle Proben vor der Messung methyliert werden.

Der analoge Effekt sowohl bezüglich des optimalen pH-Werts als auch der Bindung des Methylesters wurde bei einem RIA für Abscisinsäure [273] gefunden, für den die gleiche Kopplungsmethode verwendet wurde.

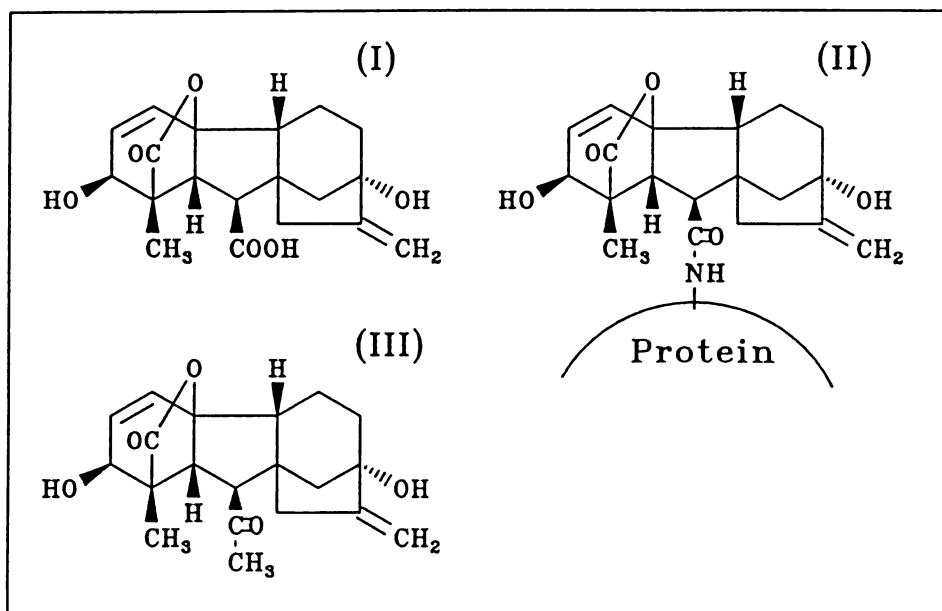


Abb. 11: Vergleich von Analyt, Immunogen und Gibberellinsäure-Methylester. Die negative Ladung des Analyten (I) ist nicht im Immunogen vorhanden, folglich wird der ungeladene Methylester über 100fach empfindlicher detektiert als das Carboxylat.

Völlig gleichartige Probleme treten bei der Herstellung von Immunoassays für Chlorphenoxyalkancarbonsäuren (z.B. 2,4-D oder 2,4,5-T) auf. Hier wird fast immer an der (stark aciden,  $pK_a=2.64$ ) Carbonsäure gekoppelt [274]. So erhält man relativ unempfindliche Tests, die hohe Kreuzreaktionen gegen die analogen Ester bzw. Amide aufweisen [275]. Nur mit Tritium-markierten Tracern war es in diesem Fall möglich, einen etwas empfindlicheren (Testmittelpunkt C = 10  $\mu\text{g/L}$ ) Immunoassay herzustellen. Es zeigt sich hier sehr deutlich, daß die Immunisierung strukturell zu ungezielt war. Die Hauptmenge der Antikörper ist gegen Substanzen gerichtet, die analytisch geringes Interesse besitzen. Nur mit intern gelabelten Substanzen gelingt es, die wenigen, eher zufällig entstandenen Antikörper gewünschter Spezifität anzusprechen.

Letzte Zweifel an dieser Regel sollten die kürzlich publizierten Kreuzreaktionsdaten eines Bromacil-ELISAs [276] ausräumen. Die zur Immunisierung verwendete homologe Carbonsäure hatte nur eine Kreuzreaktion von 2 % relativ zu Bromacil (Abb. 13).

**Regel 3:** *Es sollten im Konjugat keine sterischen Restriktionen auftreten.*

Dies ist als ein Plädoyer für die Verwendung von langen Spacern zu verstehen. Es ist unbestritten, daß auch bei der Stimulation von Immunzellen eine direkte Wechselwirkung zwischen Epitop und Rezeptor stattfinden muß. Sind bestimmte Gruppen sterisch abgeschirmt, so sind sie maskiert und können den Vorgang der Antikörperinduzierung nicht beeinflussen. Daher erscheint es sinnvoll, die Präsentation der Haptene optimal zu gestalten.

**Regel 4:** *Durch die Derivatisierung dürfen keine wichtigen funktionellen Gruppen verloren gehen oder stark verändert werden.*

Auch dies wird sehr oft nicht beachtet. So verwendeten VERSCHOOR et al. [203] ein Immunogen, dessen Hapten mit dem hier synthetisierten i-Pr/Et/C6<sup>11</sup> identisch ist. Vergleicht man diese Verbindung mit Atrazin, so erkennt man, daß das Chloratom substituiert wurde. Die Folge war, daß der isolierte monoklonale Antikörper zwar das Hapten binden konnte, jedoch nicht für die Bestimmung von Atrazin geeignet ist. Auch die viel verwendeten Ametrynsulfoxid-Konjugate (siehe S. 32) stellen ähnliche Strukturen dar. Völlig im Einklang mit Regel 4 liefern diese Immunogene zwar gute Antikörpertiter, jedoch bei unzureichenden Empfindlichkeiten und unerwünschten Kreuzreaktionsmustern. Daher werden diese Konjugate bei Immunisierungen in neuerer Zeit nicht mehr verwendet. Das positive Gegenbeispiel ist das sehr erfolgreiche Konjugat, das mit Hilfe des Haptens i-Pr/Cl/C6 hergestellt wurde. Hier konnten alle wichtigen Gruppen erhalten werden, der Spacer wurde an einem sterisch freistehenden Kohlenstoff unter formalem Verlust eines einzigen Wasserstoffatoms angebracht, die räumliche Struktur des Moleküls dürfte weitgehend mit Atrazin übereinstimmen.

Es ist sicher kein Zufall, daß bei den Arbeiten von GOODROW et al. [193] nur die i-Pr/Cl/C6-Immunogene selektive Atrazin-Seren lieferten. Die Thioderivate i-Pr/Et/3MPS und Et/Et/3MPS induzierten die Bildung von Antikörpern, die bevorzugt Thioderivate binden. Diese starke Differenzierung ist insofern beachtenswert, als daß Schwefel oft als immunologischer Ersatz für Chlor verwendet wird. Diese Approximation scheint also nur mäßig zu gelingen und kann daher nicht allgemein empfohlen werden.

**Regel 5:** *Durch den Spacer sollen in unmittelbarer Nähe des Analytmoleküls keine neuen charakteristischen Gruppen eingeführt werden.*

Dies ist eine Erweiterung der Regel 4 und soll bedeuten, daß z.B. die Einführung eines Heteroatoms die Polarität, Acidität, Elektronendichte etc. stark verändern kann. Man denke nur an den Übergang von Benzol zu Anilin oder Phenol. Noch krassere Beispiele sind aus der Literatur bekannt. So werden nicht selten zu Kopplungszwecken Nitrogruppen in Aminogruppen überführt [277]. Auch Azokupplungen können nicht als ideal gelten.

---

<sup>11</sup> Erklärung siehe ABKÜRZUNGEN.

**Regel 6:** *Charakteristische Gruppen, die gut differenziert werden sollen, müssen vom Protein abgewandt angeordnet sein.*

Diese Erkenntnis stammt im Kern schon von LANDSTEINER [278]. Gruppen, die in der Nähe des Spacers liegen oder "hinter" einem sterisch anspruchsvollen Molekülteil liegen, werden oft ignoriert oder zumindest nicht streng unterschieden. Möglicherweise kann aus räumlichen Gründen eine Antikörperbindungsstelle nicht jede "Hinterschneidung" erfassen. Somit bilden sich "Hohlräume", die natürlich nicht zur Differenzierung beitragen können. In diesen Problemkreis gehört die Tatsache, daß Antiseren, die mit i-Pr/Cl/C6-Konjugaten gewonnen wurden (Serum C193), immer hohe Kreuzreaktionen zu Propazin zeigten, obwohl die Differenzierung an anderen Molekülteilen oft hervorragend ist. Die fragliche Stelle im Hapten des Immunogens entspricht genau dem eigenen "Windschatten" des Moleküls. Ein völlig analoges Verhalten zeigt das Serum C10, das zur Bestimmung von Desalkylmetaboliten mit Hilfe des Haptens H/Cl/C6 gewonnen wurde. Die Kreuzreaktionen der Verbindungen H/Cl/Et (Desisopropylatrazin) und H/Cl/i-Pr (Desethylatrazin) fast gleich groß. Der Unterschied bezogen auf das Immunogen liegt exakt an der gleichen Stelle, wo das Propazin-Problem auftritt. Sieht man die Sache positiv, so kann man auch daran denken, diesen "Molekülschatten" dazu auszunutzen, Spacer ohne negative Folgen auf eine eigentlich "verbotene" Art anzubringen.

**Regel 7:** *Der Spacer sollte nicht sterisch anspruchsvoll sein.*

Diese Regel kann durch Arbeiten von GEE et al. [279][280] illustriert werden. Immunoassays für das Thiocarbamat Molinat (I) wurden durch Immunisierung mit zwei unterschiedlichen Konjugaten (II) und (III) entwickelt (Abb. 12). Das Derivat (II) ist nicht sperrig und entspricht der Regel ungefähr. (II) wurde mittels Gemischter Anhydridmethode an KLH gekoppelt. Bedauerlicherweise wurde keine Immunisierung mit dem gleichfalls synthetisierten analogen C<sub>6</sub>-Derivat durchgeführt. Die Verbindung (III) mit einem sterisch anspruchsvollen und wenig flexiblen Spacer wurde mittels Diazotierung an ein Protein gekoppelt. Nur das Konjugat des Haptens (II) lieferte nutzbare Antikörper. Eine analoge Beobachtung wurde bei einem Immunoassay für das chemisch verwandte Herbizid EPTC (Eptam) gemacht [279].

**Regel 8:** *Die Anbringung des Spacers sollte bevorzugt durch C-C-Chemie geschehen.*

Dies ist natürlich nicht wörtlich gemeint, sondern kann sich auf eine formale C-C-Knüpfung beschränken, wie z.B. im i-Pr/Cl/C6. Gerade diese Verbindung ist ein gutes Beispiel für die erfolgreiche Anwendung dieses Prinzips. In einer neuen Publikation [276], die über einen ELISA zur Bestimmung von Bromacil (Abb. 13, I) berichtet, wurde Regel 8 eindrucksvoll bestätigt. Als Kopplungsstelle für einen Carbonsäurespacer wurde sowohl ein Ringstickstoff-Atom, als auch eine C-C-Knüpfung mittels einer Malonestersynthese verwendet. Obwohl das Immunogen mit C-N-Knüpfung (III) einen längeren Spacer als das Hapten (II) besitzt,

ermöglicht das C-C-geknapfte Hapten einen 15fach empfindlicheren Test. Dies unterstreicht die hohe Priorität dieser Regel. Bei identischen Spacerlängen ist ein noch größerer Unterschied zu erwarten.

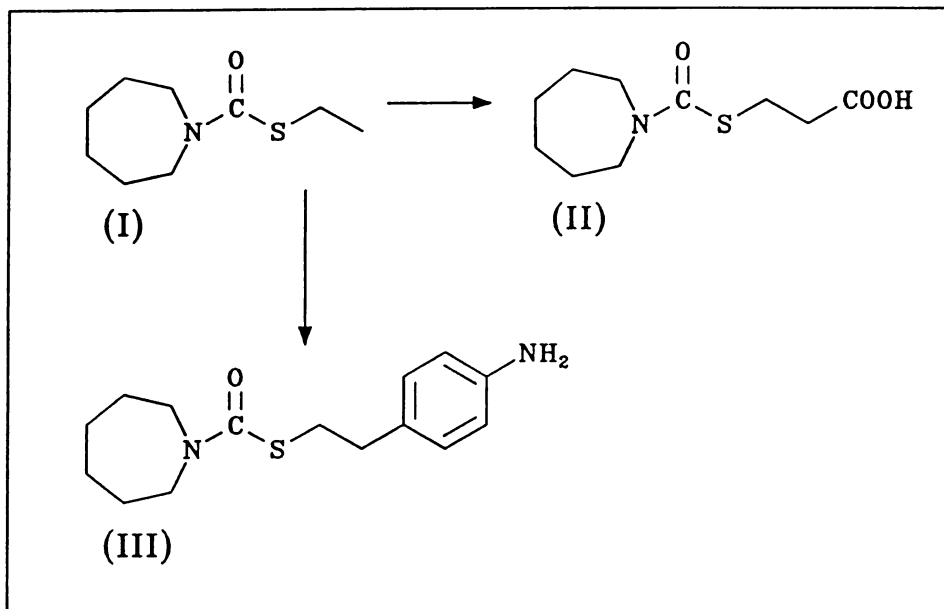


Abb. 12: Haptene für die Gewinnung von Molinat-Antikörpern.

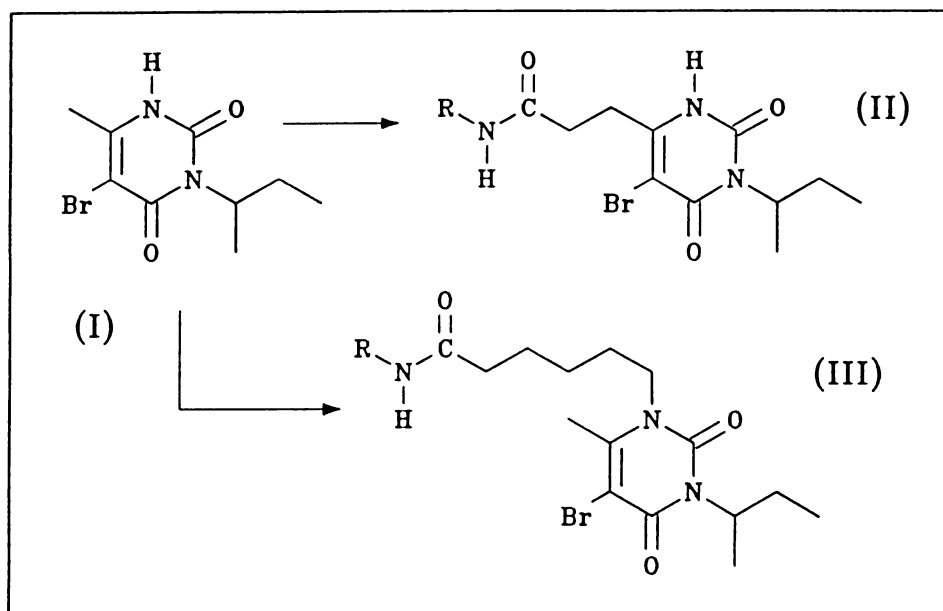


Abb. 13: Haptene für die Gewinnung von Bromacil-Antikörpern.

Einen wichtigen Artikel zum Thema dieses Abschnitts haben HARRISON et al. [281] veröffentlicht. Es kann die Meinung der Autoren nur unterstrichen werden, daß die Investitionen in die Synthese und deren Planung mindestens genauso groß sein sollen, wie der Aufwand im immunologischen Teil. Mängel in einem der beiden Gebiete können durch vermehrte Anstrengungen im anderen Bereich nicht kompensiert werden. Auch sollte man daran denken, negative Ergebnisse der Öffentlichkeit zugänglich zu machen, da sie wertvolle Hinweise auf zukünftiges Vorgehen geben können.

Hingewiesen werden soll auf die Problematik der chemischen und biochemischen Stabilität von Haptenen. Diesem Punkt wurde bisher nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Es muß jedoch klar sein, daß bei einer Immunisierung das Immunogen in eine biochemisch "aggressive" Umgebung entlassen wird. Zahllose Enzyme versuchen, gezielt oder ungezielt, einen Um- oder Abbau des injizierten Derivats zu erreichen. Auch rein chemische Prozesse können eine Derivatisierung oder einen Zerfall verursachen. Hydrolyse [246] ist nur das bekannteste Beispiel. Diese Metabolisierung ist je nach Stoffklasse extrem unterschiedlich schnell. Es ist daher denkbar, daß es Haptene gibt, die eine zu kurze Lebensdauer im Blut haben, um immunogen zu wirken. Hier ist die Frage angebracht, ob nicht ein Immunoassay gegen einen (stabileren) Metaboliten sinnvoller wäre. Völlig unnötige Probleme handelt man sich ein, wenn nicht das Hapten an sich, sondern der Spacer oder die Anbindungsstelle labil ist (z.B. Phenolester). Hier ist eine verbesserte Synthese mit stabilen Kopplungen gefragt. Ausreichende Stabilität ist nicht nur Voraussetzung für eine Immunisierung, sie vereinfacht auch die Herstellung und Lagerung von Enzymkonjugaten.

### 3 Sensitivität

#### 3.1 Allgemeines

Die Empfindlichkeit eines Tests wird oft unterschiedlich definiert [282]. So verstehen darunter einige Autoren die Steigung einer Eichkurve. Andere meinen den Testmittelpunkt oder die Nachweisgrenze. Auch die Nachweisgrenze wird sehr unterschiedlich definiert: Nullwert minus  $n$  Standardabweichungen oder  $X\%$ -Inhibition was identisch ist mit  $(100-X)\% B/B_0$ . Da die statistisch korrekte Berechnung einer Nachweisgrenze bei sigmoidalen Eichkurven und heteroskedastischen Fehlern recht komplex ist [283], wird hier die Nachweisgrenze als Mittelwert des Nullwerts minus 3 Standardabweichungen definiert [104][284]. Nimmt man einen maximalen Variationskoeffizient von 5% an und ersetzt man den Nullwert durch den stabileren Parameter  $A$ , so gelangt man über die  $3s$ -Definition zwanglos zur 15% Inhibition-Definition (oder 85% normierte Absorption) [285]. Besonders anschaulich ist die Darstellung von Vertrauensbereichen ("confidence interval") bzw. Präzisionsprofilen. Die Berechnung ist zwar keineswegs trivial [286], aber lohnt sich bei Routine-Assays sicherlich.

Die Sensitivität eines Tests ist ein sehr wichtiges Qualitätskriterium. Da die Sensitivität primär auf der Affinität des Antikörpers zum Analyten beruht [287], ist es nicht verwunderlich, daß unter üblichen Bedingungen die Affinitätskonstante bestimmend für die maximal erreichbare Sensitivität ist. Es erscheint aber recht merkwürdig, daß dieser hohe Stellenwert der Affinitätskonstante im kommerziellen Bereich weitgehend ignoriert wird. So werden von vielen großen Firmen monoklonale und polyklonale Antikörper verkauft, ohne die geringsten Informationen über die Affinität machen zu können. Niemand kann daher vorher abschätzen, ob ein Antikörper für eine Anwendung empfindlich genug ist.

Die geringe Verbreitung von Angaben zur Affinität hat natürlich handfeste Gründe. Die Bestimmung von Affinitätskonstanten war bisher eine teure und aufwendige Angelegenheit. Zudem brauchte man ein radioaktives Derivat, das nur in selteneren Fällen (für RIAs) kommerziell zugänglich ist. Daher wurde aus Kostengründen auf eine Bestimmung der Affinität bei vielen Firmen verzichtet. Dies könnte sich nun aber grundlegend ändern. Die im Abschnitt über Gleichgewichtskonstanten (S. 115) vorgestellte Methode ist so einfach, daß sie von jedem ELISA-Labor routinemäßig mit geringem Aufwand durchgeführt werden kann.

Verursacht durch die Verwirrung bei der Definition der Empfindlichkeit eines (kompetitiven) Immunoassays werden auch unvereinbare Konzepte vorgeschlagen, optimale Sensitivität zu erreichen. So haben YALOW und BERSON basierend auf der Steigungsdefinition abgeleitet, das Optimum läge bei einer Antikörperkonzentration von  $1/K$ . EKINS et al. konnten dagegen zeigen, daß empfindliche Messungen nur bei  $[Y] \rightarrow 0$  möglich sind [288]. Diese Publikation ist auch als Diskussion über das Thema Empfindlichkeit sehr informativ. Sie gibt eine sehr anschauliche Erklärung für das Phänomen der Affinitätslimitierung und diskutiert die prinzipiellen Unterschiede von kompetitiven und nicht-kompetitiven Assays.

### 3.2 Strukturelle Überlegungen

Die wichtigsten Punkte wurden schon im Abschnitt "Strukturelle Aspekte" angesprochen. Hier soll nur noch auf die speziell sensitivitätsrelevanten Bereiche eingegangen werden.

Die stärkste Einflußnahme auf den Testmittelpunkt ist über den Antikörper möglich. Müssen erhebliche Verbesserungen der Sensitivität erreicht werden, dann ist nur die Herstellung eines neuen Antikörpers rentabel. Erst wenn nur noch geringe Verbesserungen notwendig sind, sollte man an Optimierungsmaßnahmen denken. Die hohe Priorität des Antikörpers erzwingt die sorgfältige Planung von Haptensynthese, Kopplung und Immunisierung.

Bei monoklonalen Antikörpern kann in Grenzen eine mittelmäßige Immunisierung ausgeglichen werden. Durch ein optimales Screening und einem erhöhten Suchaufwand könnte der betreffende Antikörper doch noch gefunden werden. Auch hier stellt sich jedoch die Frage, ob ein gut designtes Immunogen nicht die schnellste und rentabelste Lösung darstellt.

Viel Aufwand wird in die Optimierung von Tracern und immobilisierten Haptenderivaten gesteckt. Dahinter steckt die Vermutung, daß sich die Empfindlichkeit noch erheblich verbessern ließe. Besonders heterologe Testkombinationen aller Art sind sehr beliebt. Realistischerweise muß man jedoch sehen, daß hier meist nur geringe Verbesserungen möglich sind, die sich häufig in der Nähe der Signifikanzgrenze bewegen.



### 3.3 Kinetische Überlegungen

Kompetitive Immunoassays sind, wenn sie einer Optimierungsphase unterworfen waren, sehr oft affinitätslimitiert. Das heißt, daß nur die Gleichgewichtskonstante des Antikörpers die Nachweisgrenze bestimmt. Kinetische Varianten können zwar dazu dienen, diese Grenze möglichst einfach zu erreichen, durchbrochen werden kann sie normalerweise jedoch nicht. Eine Ausnahme stellt die folgende, etwas exotische Methode dar, die auf kinetischen Eigenschaften basiert. So wurden von FREYTAG et al. [289] ein Test auf Basis einer Affinitätsäule vorgestellt, der die Affinitätslimitierung üblicher kompetitiver Tests überwindet. Der Analyt wird hier mit einem großen Überschuß an  $F_{ab}$ -Enzym-Konjugat versetzt. Nachdem sich der Hapten- $F_{ab}$ -Komplex gebildet hat, wird die Mischung über eine Affinitätsäule mit immobilisiertem Hapten gegossen. Die Kapazität der Säule muß so bemessen sein, daß das  $F_{ab}$ -Konjugat problemlos quantitativ gebunden werden kann. Die Säule verlassen dann nur  $F_{ab}$ -Konjugate, die ein Analytmolekül gebunden haben. Die Menge des durchgelaufenen Konjugats wird über die Enzymaktivität photometrisch gemessen. Dieser Test ist im Gegensatz zu allen anderen Hapten-Immunoassays nicht durch die Gleichgewichtskonstante, sondern durch die Dissoziationskonstante des Analyt/Antikörper-Komplexes limitiert.

Zu den üblichen kinetischen Varianten kann die sequentielle Inkubation gezählt werden. Der Analyt wird zuerst mit dem Antikörper vorinkubiert, dann wird der Tracer zugesetzt. Im Bereich der RIAs wird dieses Verfahren, das dort "kalte"<sup>12</sup> Vorinkubation genannt wird, schon seit langem zur Steigerung der Empfindlichkeit eingesetzt [290][291]. Interessanterweise hat sich die Kurzinkubation von Tracern bisher nicht allgemein durchsetzen können, trotz der unbestrittenen Sensitivitäts- und Zeitvorteile.

### 3.4 Testdesign

Besonders häufige Kontroversen entwickeln sich um die Frage Antikörper-Immobilisierung oder Antigen-Immobilisierung. Beide Tests haben ihre Vorzüge, doch im Bereich der Sensitivität ist der Antikörper-immobilisierte Test eindeutig überlegen [47][48]. Diese Variante hat auch Vorteile bezüglich unspezifischer Bindung und einfacherer Testdurchführung. Zudem ist es günstiger, das größte Reagenz-Molekül zu immobilisieren, da andernfalls verstärkt Diffusionsprobleme auftreten können (Antikörper  $M_r$  160.000 gegenüber POD  $M_r$  40.000). Andere Testkonfigurationen haben im Bereich der Umweltanalytik bislang keine Bedeutung erlangt. Dies hängt mit der Größe der zu untersuchenden Moleküle zusammen: Kompetitive Immunoassays bieten weniger (sinnvolle) Möglichkeiten zur Variation des Testaufbaus als nicht-kompetitive.

In neuerer Zeit ist eine Firma mit Immunosäulen auf den Markt gekommen [292], die behauptet, ihr Testdesign führe zu einer erheblich verbesserten Empfindlichkeit. Basis ist eine

---

<sup>12</sup> "Kalt" bedeutet hier nicht-radioaktiv.

Affinitätssäule, die mit großen Mengen Antikörper beladen ist. Postuliert wird nun, daß beim Durchlaufen einer Wasserprobe der Analyt festgehalten und angereichert wird. Gibt man nun einen Tracer auf die Säule (Peroxidase), so läuft ein üblicher kompetitiver Test ab. Vom theoretischen Standpunkt ist es mehr als zweifelhaft, ob diese Konfiguration irgendwelche Vorteile bietet. Es läßt sich leicht zeigen, daß bei allen kompetitiven Immunoassays (eine Ausnahme bildet das Verfahren von FREYTAG et al. [289]) die Empfindlichkeit abnimmt, wenn die Antikörperkonzentration zunimmt. Maximale Empfindlichkeit wird also bei einer minimalen Antikörperkonzentration erreicht. Da dieses Verhalten vom Design und vom Label völlig unabhängig ist, dürfte diese Regel auch für diesen neuen Test gelten.

Das gleiche gilt für die Methode von HUBER [182], der durch die Verwendung von antikörperbeladenen Polystyrolperlen erhebliche Empfindlichkeitssteigerungen im Vergleich zum Mikrotiterplattenformat erreicht haben will. Zumindest liegt der Mechanismus einer solchen Verbesserung völlig im Dunkeln.

### 3.5 Sonstige Einflüsse

In diesem Abschnitt wird eine breite Auswahl an Methoden vorgestellt, die zumindest als empfindlichkeitssteigernde Maßnahme diskutiert wurden.

Beim Vorliegen eines mittelmäßigen Antiserums wird oft versucht, durch Affinitätschromatographie eine Verbesserung herbeizuführen. Bei Hapten-Immunoassays hat dieses Verfahren jedoch nur unbedeutende Erfolge vorzuweisen. Es ist einleuchtend, daß bei einer Affinitätschromatographie das Spektrum der Antikörperpopulationen verändert wird. Es können jedoch keine "besseren" Antikörper isoliert werden können als im Serum vorhanden sind. Bei vielen Hapten-Immunoassays verhalten sich zudem die Antikörper "pseudomonoklonal" [231], d.h. eine Fraktion (vermutlich die beste) dominiert den Test, auch ohne Vorreinigung des Serums.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde versucht, einen besseren Carrier für Hapten-immobilisierte Antikörper zu finden [293]. Die Unterschiede in den Testmittelpunkten sind jedoch gering. Zudem wurde mit einer antikörperimmobilisierten Variante ein mindestens um den Faktor 2 niedrigerer 50%-Wert erzielt [285].

Das Thema Label wurde schon in der Einleitung ausführlich behandelt. Da aber so viele Anstrengungen in dieser Richtung unternommen werden, soll noch ein Resümee gezogen werden:

Bei einer Diskussion um Label für Immunoassays darf nicht die Differenzierung zwischen kompetitiven und nicht-kompetitiven Assays vergessen werden [294]. Nur bei den letzteren führt eine Verbesserung der Nachweisgrenze des Labels auch zu einem verbesserten Test. Bei kompetitiven Tests (alle Pestizid-Immunoassays fallen in diese Klasse) genügt es, ein ausreichend empfindliches Label zu verwenden. Wobei der Ausdruck "ausreichend" relativ

zur Affinitätskonstante des Antikörpers gesehen werden muß: D.h. nur Antikörper mit extrem hohen Affinitätskonstanten können bessere Label ausnutzen. Dieser Sachverhalt wird oft übersehen und führt zu vielen Publikationen, die von der erfolglosen Anwendung eines neuen Labels zur Verbesserung eines kompetitiven Immunoassays berichten [121]. Dieses Problem tritt völlig analog auch bei sehr hochentwickelten sog. Verstärkungsreaktionen [295] auf. So wird das in vielen Bereichen hilfreiche Biotin-Avidin-System mit sehrmäßigem Erfolg zur Optimierung von kompetitiven Immunoassays verwendet. Auch Enzym-Kaskaden [110], die extreme Verstärkungsfaktoren erreichen, sind hier zu nennen. Diese Unterfangen mißlingen zur Überraschung vieler Experimentatoren regelmäßig, weil fast alle dieser kompetitiven Immunoassays in einem weitgehend affinitätslimitierten [41] Bereich arbeiten.

JACKSON und EKINS [105] haben eine fundamentale Gleichung für kompetitive Immunoassays formuliert, die die maximal erreichbare Sensitivität angibt:

$$\text{Empfindlichkeit}_{\max.} = \frac{CV_0}{K} \quad (\text{Gl. 25})$$

mit  $\text{Empfindlichkeit}_{\max.}$  Standardabweichung der Messung der Konzentration 0 [mol/L]  
sowie  $CV_0$  Variationskoeffizient bei der Konzentration 0  
und  $K$  Affinitätskonstante des Analyten [L/mol]

Es ist leicht ersichtlich, daß neben dem bei unterschiedlichen Tests fast konstanten Variationskoeffizient  $CV_0$  nur die Affinitätskonstante des Antikörpers in das Ergebnis einght. Sollte bei einem beliebigen kompetitiven Immunoassay eine Nachweisgrenze in der Nähe dieses theoretischen Werts erreicht werden, so ist Affinitätslimitierung vorherrschend.

Wenn es keine Anzeichen gibt, daß der Test seine thermodynamische Grenze erreicht hat, ist es sinnvoll, ein besseres Label zu suchen und zu verwenden. Ist aber der Testmittelpunkt (oder Nachweisgrenze) am durch die Affinitätskonstante festgelegten Grenzwert angekommen, sind alle weiteren Bemühungen zum Scheitern verurteilt.

Eine weitere, sehr direkte Methode setzt an der Affinitätskonstante an. So kann bei einer geeigneten thermodynamischen Konstellation eine Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante vorhanden sein. Eine entsprechende Veränderung der Temperatur (meist Abkühlung) ergibt dann eine Verbesserung des Testmittelpunkts. Bedauerlicherweise wurde gefunden, daß viele Haptenkomplexe eine sehr geringe Temperaturabhängigkeit zeigen.

Als "letzte" Möglichkeit möchte ich die Anreicherung bzw. Extraktion anführen. Sie ist von der Anwendung her sicher nicht optimal zu nennen, bei extremen Matrixproblemen bleibt jedoch kaum ein anderer Ausweg (z.B. Rückstandsanalytik in Lebensmitteln [296]). Auch ist es denkbar, auf diese Weise in fast unvorstellbar niedrige Konzentrationsbereiche vorzustoßen, vorausgesetzt, die Anreicherung funktioniert auf diesem Konzentrationsniveau

noch. Man sollte sich jedoch im Klaren sein, daß man mit Anreicherungsverfahren den Bereich der Screeningmethode verläßt und eine aufwendige Labormethode entsteht.

In diesen Bereich sind auch Immunoaffinitätsäulen einzuordnen, die aufgrund ihrer überlegenen Selektivitätseigenschaften wohl allen anderen Anreicherungsverfahren weit überlegen sind. Die besonders bei hohen Antikörperkonzentrationen hervorstechenden Selektivitätslücken (strukturanaloge Verbindungen) weisen darauf hin, daß Immunoaffinitätsäulen mit besonderem Vorteil in Kombination mit klassischen analytischen Verfahren (z.B. GC [297]) angewendet werden sollten.

## **4 Selektivität**

### **4.1 Allgemeines**

Die Selektivität von ELISAs oder Immunoassays im allgemeinen wird gelegentlich kritisch beurteilt. Dies ist manchmal begründet und bezieht sich auf die unvermeidlichen Kreuzreaktionen. Oft beruht dieses Mißtrauen aber auch nur auf mangelnder Information: Immunoassays werden mit Biotests gleichgesetzt und man vermutet daher, daß die Komplexität eines lebenden Systems nur sehr vage Aussagen in der Art einer Toxizität ermögliche. Daß Immunoassays rein chemische Systeme darstellen, die sich mit physikochemischen Gesetzen restlos beschreiben lassen, ist oftmals nicht bekannt. Um dieser unbegründeten Unsicherheit gegenüber "biochemischen" Molekülen entgegenzuwirken, sei hier angeführt, daß die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung in ihrer Selektivität von keiner anderen Wechselwirkung übertroffen wird. Dies sieht man besonders bei einem Vergleich der Affinitätschromatographie (mit Antikörpern) und einer klassischen präparativen HPLC. Geht man von einer identischen Matrix aus, so ist der Anreicherungsfaktor (und damit der Separationseffekt) bei einer Affinitätschromatographie leicht um mehrere Zehnerpotenzen besser.

Selektivität von Immunoassays war kein expliziter Schwerpunkt dieser Arbeit. Da aber Sensitivität und Selektivität eng miteinander verknüpft sind, und zur Charakterisierung von Antikörpern immer eine Bestimmung der Kreuzreaktionen gehört, stehen Daten zur Verfügung, die sich auf das Problem der Kreuzreaktionen beziehen.

### **4.2 Definitionen der Kreuzreaktion**

Obwohl in den meisten Bereichen der Immunchemie Konsens darüber besteht, wie Kreuzreaktionen zu definieren bzw. anzugeben sind, brechen doch regelmäßig Kontroversen über die "sinnvollste" Definition auf. Inzwischen hat sich eine ganze Reihe von unterschiedlichen Definitionen angesammelt, wobei sich bis jetzt keine der neuen Varianten wirklich durchsetzen konnte.

Die häufigste Form bezieht sich auf die Testmittelpunkte (C oder 50%-Wert) und wurde erstmals 1969 von ABRAHAM [298] vorgeschlagen. Es wird ein Quotient zwischen dem Testmittelpunkt der Standardsubstanz und der zu vergleichenden Substanz gebildet. Die Angabe der Kreuzreaktion  $CR$  erfolgt in Prozent relativ zur Standardsubstanz.

$$CR = \left( \frac{C_{Standard}}{C_{Test}} \right) \cdot 100\%$$

Diese Definition wird in zwei Varianten benutzt. Die molare Kreuzreaktion bezieht sich auf Testmittelpunkte in [mol/L], die massenbezogene Kreuzreaktion auf Testmittelpunkte in Massenkonzentrationen. Für Struktur-Wirkungsbeziehungen ist eindeutig die molare Form vorzuziehen. Für analytische Zwecke könnte die letzere Form Vorzüge aufweisen, da man normalerweise in Massenkonzentrationen rechnet. Es soll darauf hingewiesen werden, daß die molare Kreuzreaktion unter bestimmten Bedingungen (siehe S. 116) direkt mit den jeweiligen Gleichgewichtskonstanten der verglichenen Analyten zusammenhängt.

Von BERZOFKY und SCHECHTER [299] wurden Kreuzreaktionen aufgrund ihrer Herkunft in "shared reactivity" und "cross reactivity" differenziert. Diese Unterscheidung betont den Unterschied zwischen polyklonalen und monoklonalen Antikörpern.

Ich möchte hier weitere Unterscheidungen einführen: Kreuzreaktion von reinen Stoffen und Kreuzreaktion von Gemischen. Gemessen wird in der Regel nur die erstere; genaugenommen ist dann jedoch auch nur eine Korrektur bzw. Umrechnung von Einstoff-Lösungen erlaubt. Bei parallelen Eichkurven dürfte dies nicht zu Komplikationen führen.

Da bisher die Additivität der Inhibition bei Mischungen noch nicht nachgewiesen wurde, dürfte im allgemeinen Fall eines n-Stoff-Gemisches nur der äußerst aufwendige Weg über eine schachbrettartige (bzw. n-dimensionale) Versuchsanordnung mit jeweils variierten Analytkonzentrationen offenstehen.

Es ist lange bekannt, daß Kreuzreaktionen nur unter den Testbedingungen gültig sind, unter denen sie gewonnen wurden. Geringe Abänderungen der Testbedingungen (gewollt oder ungewollt) können zu veränderten Kreuzreaktionen führen. Es ist jedoch unbefriedigend, ein so wichtiges Charakteristikum eines ELISAs von unzähligen Versuchsparametern abhängig zu machen. Es wäre wesentlich sinnvoller, Kreuzreaktionen unter "Standardbedingungen" zu messen und sich um eine rechnerische oder semiempirische Korrektur für die einzelnen Testparameter zu bemühen.

Bei dieser Diskussion wird auch klar, daß es darüberhinaus mindestens zwei grundsätzlich unterschiedliche Kreuzreaktionen geben muß: Eine Kreuzreaktion unter Gleichgewichtsbedingungen und Kreuzreaktionen unter kinetisch limitierten Bedingungen. Da Gleichgewichtskonstanten und Dissoziationskonstanten bzw. Gleichgewichtskonstanten und Assoziationskonstanten nicht unbedingt konform gehen, ist es sehr unwahrscheinlich, daß hier identische Meßwerte erhalten werden.

Eine erste Verbesserung ist die Definition einer etwas modifizierten molaren Kreuzreaktion, die sich nicht auf die Testmittelpunkte allgemein stützt, sondern auf die Gleichgewichtskonstanten der Analyten. Zwei Angaben wären hier sehr informativ, die Gleichgewichtskonstante und die Kreuzreaktion (= normierte Gleichgewichtskonstante).

$$CR_K = \left( \frac{K_{Test}}{K_{Standard}} \right) \cdot 100\% \quad (\text{Gl. 27})$$

Die Schwierigkeit Kreuzreaktionen direkt in analytische Meßergebnisse einzurechnen, sowie die Problematik der nicht parallelen Eichkurven hat dazu geführt, daß andere Definitionen vorgeschlagen wurden. Sie unterscheiden sich in erster Linie von der vorgenannten Definition, daß nicht eine konstante "Hemmung" verglichen wird, sondern eine bestimmte Standard-Konzentration (z.B.  $CR_{(1ng)}$  [300][301]).

$$CR_{(1ng)} = \frac{\text{Inhibition(Tests substanz)}_{1ng}}{\text{Inhibition(Standard)}_{1ng}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (\text{Gl. 28})$$

Es ist offensichtlich, daß diese Methode nicht einer gewissen Willkür in der Wahl dieser Konzentration entbehrt. Die Auswahl mehrerer Konzentrationen kann dieses Dilemma zwar etwas mildern, aber nicht lösen. Eine neue Variante wurde erstmals von ULRICH et al. [302] vorgeschlagen und von KEUCHEL et al. [303] bei TNT-ELISAs sowie von MEISENECKER [304] bei PAH-ELISAs angewendet. Sie könnte man als Hybridform der  $CR_{(1ng)}$ - und der 50%-Wert-Methode ansehen. Die Definition lautet:

$$\text{Abs(Standardsubstanz)}_{1\mu\text{g/L}} = \text{Abs(Tests substanz)}_x \mu\text{g/L} \quad (\text{Gl. 29})$$

mit  $CR_{\text{Hybr.}(1\mu\text{g/L})} = x \mu\text{g/L}$ , wobei  $1 \mu\text{g/L}$  durch jede beliebige sinnvolle Konzentration ersetzt werden kann.

Diese Methode ermöglicht es, die Kreuzreaktionen in verschiedenen Konzentrationsbereichen halbquantitativ zu vergleichen. Will man aber die Kreuzreaktion einer unbekannt Probe umrechnen, so benötigt man die Meßwerte bei genau dieser Konzentration, die zufälligerweise kaum zur Verfügung stehen dürfte. Daten aus der Literatur wären so gut wie nicht vergleichbar, jeder würde die Kreuzreaktion bei einer gerade genehmen Konzentration angeben. In der Konsequenz führt dies zu einem Kreuzreaktionsprofil in Abhängigkeit der Konzentration der beiden zu vergleichenden Analyten. Der einfachste Fall von zwei kreuzreagierenden Substanzen wurde 1977 von LLEWELYN et al. [305] bearbeitet. Der allgemeine mehrdimensionale Fall ist jedoch in der Praxis schwerlich zu realisieren: Man benötigt eine riesige Menge Meßdaten aus sehr vielen Konzentrationskombinationen. Es ist im Moment kaum denkbar, auch nur für einen Test und ein Substanzpaar diese Meßarbeit routinemäßig zu leisten. Zudem kann vermutet werden, daß dieses Profil einen erheblichen Anteil an redundanter Information enthält.

Eine Diskussion über die Vor- und Nachteile von fünf unterschiedlichen Methoden Kreuzreaktionen zu berechnen, haben kürzlich MILLER und VALDES [306] publiziert. Sie befürworten die klassische Methode über den 50%-Wert, sowie ein "Interferogramm", das der mehrdimensionalen Bestimmung der Kreuzreaktion in Mischungen entspricht.

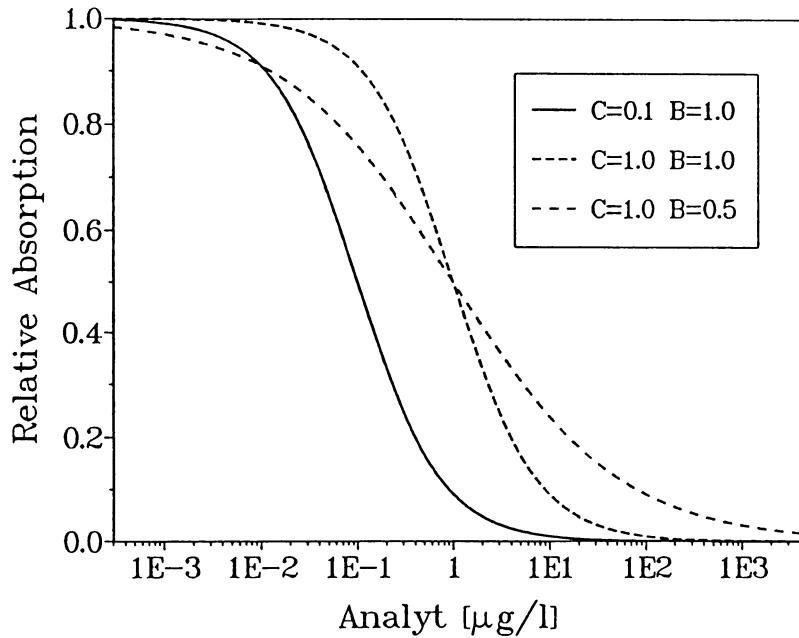
Überlegungen zum Thema Kreuzreaktionen sollten von der möglichen Form der Eichkurven ausgehen. Die von RODBARD eingeführte 4-parametrische logistische Funktion (siehe S. 23) ist ein guter Ansatz. Da optimierte Hapten-Immunoassays keine Probleme mit dem "Überschußwert"<sup>13</sup> haben, kann der Einfluß der Parameter A und D vernachlässigt werden. Im einfachsten Fall nimmt der Steigungsparameter B den Wert 1 an. Unter diesen Umständen sind alle Eichkurven parallel. Eine (häufig auftretende) Abweichung des Werts B von 1 führt zur Nicht-Parallelität (Abb. 14). Hier soll an diesen synthetisch erzeugten Eichkurven gezeigt werden, welche Auswirkungen verschiedene Definitionen von Kreuzreaktionen haben. Um die willkürliche Wahl von Testwerten zu vermeiden, wurden vollständige Kreuzreaktionsprofile berechnet, die die Abhängigkeit von der Analytkonzentration angeben. Im Prinzip können weitgehend alle bisher benutzten Methoden auf zwei Verfahren zurückgeführt werden. Die erste Klasse enthält die übliche 50%-Methode und berechnet den Quotienten bei identischen (relativen) Absorptionen, z.B. 50 %. Dies kann leicht für alle normierten Absorptionswerte zwischen 0 und 100 % verallgemeinert werden. Die zweite Klasse enthält die 1 ng-Methode von DE LAUZON [301], die parallel zur Ordinate arbeitet und zwei Inhibitionswerte ( $1 - \text{Abs}_{\text{norm}}$ ) verwendet. Auch hier ist die Verallgemeinerung einfach: Man wählt nicht nur eine oder wenige Konzentrationen, sondern berechnet die Kreuzreaktionen in einem ganzen Konzentrationsintervall. Für beide Fälle, konstante Absorption bzw. konstante Konzentration, wurden die Kreuzreaktionsprofile für die in Abb. 14 angegebenen Eichkurven berechnet.

In Abb. 15 sind die erhaltenen Kreuzreaktionsprofile in Abhängigkeit von der Analytkonzentration dargestellt. Es wird jeweils eine parallele ( $B=1.0$ ) und eine nicht-parallele Eichkurve ( $B=0.5$ ) verglichen.

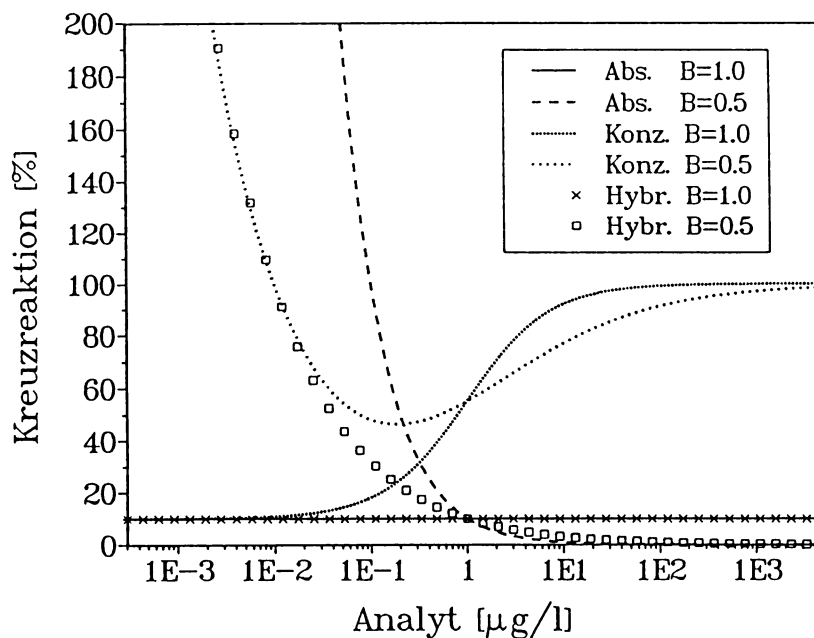
Die Methode der konstanten Absorption führt bei parallelen Eichkurven zu einer über den gesamten Konzentrationsbereich identischen Kreuzreaktion von 10 %. Das bedeutet, daß bei parallelen Eichkurven keine Konzentrationsabhängigkeit der üblichen Kreuzreaktion existiert. Bei nicht-parallelen Eichkurven dagegen ändert sich das Bild drastisch. Die Kreuzreaktion beginnt bei hohen Konzentrationen sehr niedrig und steigt dann stark an. Deshalb ist bei nicht-parallelen Eichkurven die Angabe eines einzelnen Kreuzreaktionswerts nicht adäquat.

---

<sup>13</sup> Signal bei sehr hohen Analytkonzentrationen.



**Abb. 14:** Synthetische Eichkurven zur Diskussion der Kreuzreaktion. Erzeugt mit 4-parametriger Gleichung,  $A=1$ ,  $D=0$ ,  $C$  und  $B$  wie angegeben. Die durchgezogene Linie zeigt die Eichkurve des Analyten, die beiden gestrichelten Linien zwei kreuzreagierende Substanzen.



**Abb. 15:** Vergleich von grundlegenden Kreuzreaktionsdefinitionen. Es wurden die Kreuzreaktionen der beiden gestrichelten Kurven in Abb. 14 mit drei unterschiedlichen Verfahren berechnet, Abs.: Konstante Absorption (analog ABRAHAM), Konz.: Konstante Konzentration (analog DE LAUZON), Hybr.: "Hybrid"-Methode (normiert, analog ULRICH);  $B=1.0$  beschreibt jeweils eine parallele Eichkurve,  $B=0.5$  eine nicht-parallele,  $C_{Kreuz}=1.0 \mu\text{g/L}$ ,  $C_{Analyt}=0.1 \mu\text{g/L}$ .



Die Methode der konstanten Konzentrationen führt bei niedrigen Analyt-Konzentrationen zu einer Kreuzreaktion, die dem üblichen Wert (10 %) nahekommt. Bei hohen Analyt-Konzentrationen dagegen erhält man recht kuriose Werte: die Kurve nähert sich asymptotisch 100 %. Bei einer nicht-parallelen Eichkurve ( $B=0.5$ ) wird eine Kurve mit ausgeprägtem Minimum erhalten.

In der Mitte der beiden Verfahren bewegt sich die "Hybrid"-Methode. Für die Auftragung in Abb. 15 wurde eine Normierung vorgenommen, die einer Division durch die Konzentration der Referenzsubstanz entspricht. Bei parallelen Eichkurven erhält man identische Werte im Vergleich zur Absorptionmethode: Eine konstante Kreuzreaktion von 10 %. Die Grenzfälle hohe bzw. niedrige Konzentration bei nicht-parallelen Eichkurven entspricht der Absorptionmethode bzw. der Konzentrationsmethode.

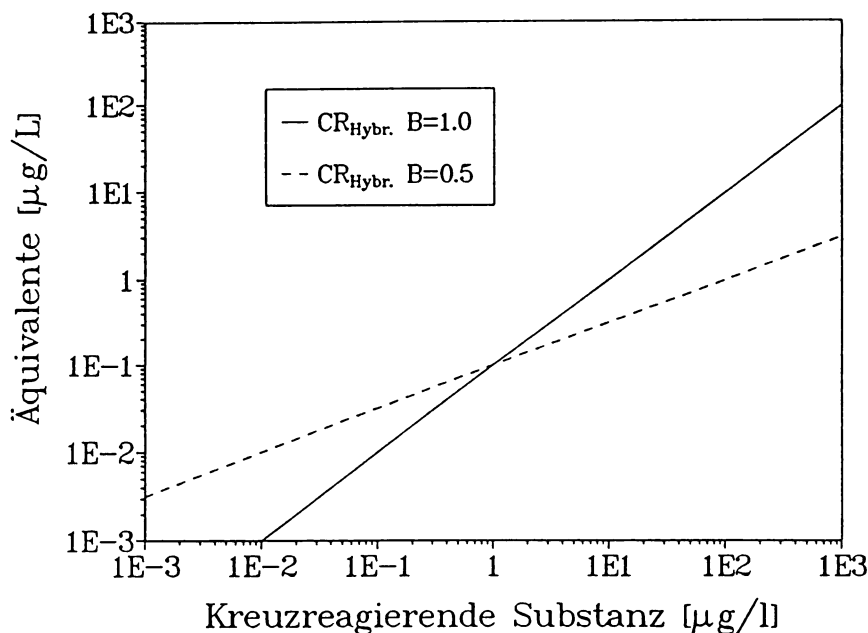


Abb. 16: Darstellung der Kreuzreaktionen nach der "Hybrid"-Methode. Verallgemeinert, da auf ein Konzentrationsintervall bezogen.

In Abb. 16 ist die Hybridmethode nochmals dargestellt, da sie in der Originalform einer Konzentrationsangabe und nicht einem prozentualen Wert entspricht. Im Gegensatz zum etwas unübersichtlichen Verlauf in Abb. 15 erweist sich der doppelt-logarithmische Plot in diesem Fall als überlegen. Man erkennt auf den ersten Blick, daß parallele Eichkurven zu einer Parallelverschiebung des  $CR_{Hybr.}$ -Plots führen. Die Kreuzreaktion von 10 % erhält man durch Umrechnen der Substanzkonzentration in Äquivalente, die hier genau 10fach niedriger liegen. Werte  $B \neq 1$  äußern sich als Änderung der Steigung.

Betrachtet man jedoch das Problem informationstheoretisch, so muß man sehen, daß trotz der teilweise recht komplexen Kreuzreaktionsprofile maximal zwei Zahlen zur Berechnung notwendig waren:  $C$  und  $B$ . Ich möchte daher im Gegensatz zu einigen o.g. Autoren vorschlagen, nicht den aufwendigen Weg eines Kreuzreaktionsprofils (evtl. mehrdimensional)

zu gehen oder untereinander kaum vergleichbare Kreuzreaktionsdefinitionen einzuführen, sondern nur noch die Werte C und B anzugeben. Alle anderen Werte lassen sich daraus leicht errechnen. Diese Überlegung zeigt auch, daß die Angabe von mehr als zwei Kreuzreaktionswerten (für eine Substanz) keine neue Information enthält und somit vollständig redundant ist.

### **4.3 Polyklonale oder monoklonale Antikörper?**

Über die Vor- und Nachteile von polyklonalen gegenüber monoklonalen Antikörpern ist schon viel geschrieben worden. Eigentlich könnte man davon ausgehen, daß inzwischen die Diskussion zu einem Ende gekommen ist. Interessanterweise kursieren jedoch immer noch Vorstellungen in diesen Publikationen, die mit der Realität nur bedingt in Einklang zu bringen sind. Was die Sensitivität angeht, so muß man sehen, daß polyklonale Antikörper den monoklonalen auf dem Gebiet der Triazinanalytik noch deutlich überlegen sind. Das macht rund eine Zehnerpotenz Empfindlichkeit aus. Dies kann daran liegen, daß bisher die Screening-Anstrengungen bei monoklonalen Antikörpern nicht massiv und nicht gezielt genug waren. Nicht völlig auszuschließen ist jedoch die Hypothese, daß Kaninchen bessere Antikörper herstellen können als Mäuse. Wirklich repräsentative Vergleiche gibt es bisher nicht. Das würde bedeuten, daß monoklonale (Maus-)Antikörper überhaupt nicht besser werden können.

Über die Selektivität wird oft behauptet, in dieser Hinsicht seien monoklonale Antikörper polyklonalen von Natur aus überlegen [36][170][213]. Das mag bei großen Antigenen durchaus stimmen: Bei den untersuchten Triazin-ELISAs ließ sich diese Annahme durch nichts erhärten. Im Gegenteil, es scheint sogar eher so, daß hochaffine polyklonale Antikörper auch hervorragende Selektivitäten aufweisen. Möglicherweise sind Sensitivität und Selektivität keine voneinander unabhängigen Variablen, sondern auf eine bisher noch nicht ganz verstandene Weise miteinander verknüpft.

Die Vorteile von monoklonalen Antikörpern liegen eher auf anderen Gebieten: Für kinetische oder mechanistische Studien sind polyklonale Antikörper nicht optimal, da sie eine zusätzliche, schwer kontrollierbare Variable aufweisen. Auch aufwendige Strukturuntersuchungen und andere Charakterisierungen sind nicht sehr sinnvoll bei Antikörpern, deren Versiegen schon abzusehen ist. Auf wissenschaftlichem Gebiet sind die Vorteile von monoklonalen Antikörpern am ausgeprägtesten. So ist es bei monoklonalen Antikörpern leicht möglich, vielen Forschungsgruppen den identischen Antikörper zur Verfügung zu stellen; die Ergebnisse sind gut vergleichbar. Auf dem Gebiet der polyklonalen Antikörper werden die Antikörper immer neu hergestellt, die Publikationen stellen immer eine Art von nicht wiederholbarem Unikat dar.

Die Vorteile von polyklonalen Antikörpern liegen auf der Applikationsseite: Niedrige Herstellungskosten, überschaubare Herstellungszeiträume, hohe Sensitivität und Selektivität machen für den Anwender von Immuntests polyklonale Antikörper sehr interessant. Das

Problem der Chargenschwankungen kann z.B. durch Immunisierung von Ziegen und Schafen recht einfach relativiert werden.

#### 4.4 Das Matrixproblem

Selektivität bezieht sich ja nicht nur auf Pestizide, Herbizide oder sogar nur Triazine. In natürlichen Wasserproben findet man eine riesige Anzahl verschiedenster Stoffklassen - in gelöster, adsorbierter oder suspensierter Form. Diese Begleitstoffe, oft etwas salopp als "Matrix" bezeichnet, liegen normalerweise in überwältigendem Überschuß relativ zum Analyten vor. Jede analytische Methode wird mit diesem Problem konfrontiert.

Für viele Matrix-Substanzen existiert nun eine "Grenzkonzentration", bei der, wenn sie überschritten wird, Störungen im Testsystem auftreten. Dies ist an sich noch nicht bedenklich: Es muß immer eine Wertung hinzukommen, wie wahrscheinlich das Überschreiten dieser "Grenzkonzentration" in einer willkürlich gezogenen Wasserprobe ist. Viele sehr leistungsfähige chromatographische Verfahren sind in Hinsicht Matrix nicht beliebig belastbar. Sehr häufig sind aufwendige Clean-up-Schritte (Vorreinigung) notwendig, bevor die eigentliche Analyse durchgeführt werden kann. Gerade diese Reinigungsschritte sind es, die viele Analysen zu einer langwierigen und teuren Angelegenheit machen.

Wasseranalysen mit einem Immunoassay sind meistens so ausgelegt, ohne Anreicherung und ohne Clean-up auszukommen. Dies ist leicht verständlich, bezieht man den ganzen Charakter dieses Verfahrens mit ein: Immunoassays sollen normalerweise schnell und billig sein, für große Probenzahlen geeignet und ohne viel Aufwand durchzuführen. Aufwendige Clean-up-Schritte oder Anreicherungen widersprechen dieser Idee völlig. Wenn man viele Stunden oder sogar Tage in die Extraktion und Reinigung einer Probe investiert hat, dann ist es irrelevant, ob die eigentliche Analyse 30 min oder 3 Stunden dauert. Auch die Kosten der Analyse spielen angesichts des hohen Einsatzes an Arbeitszeit dann keine große Rolle mehr.

Eine der häufigsten Matrixkomponenten im Wasser sind die Huminstoffe. Trotz langjähriger Forschungsanstrengungen ist ein endgültiger Durchbruch auf dem Gebiet der Charakterisierung von Huminstoffen nicht abzusehen. Die Komplexität und die strukturelle Unsicherheit machen die Arbeit mit Huminstoffen nicht gerade einfacher. Zudem ist allgemein bekannt, daß Huminstoffe sehr labile Strukturen bilden und sich leicht verändern. Es ist somit sehr schwierig "native" Huminstoffe zu isolieren und zu untersuchen. Zudem fehlen wirklich aussagekräftige Charakterisierungsmethoden für Huminstoffe.

Es gibt einige technische "Huminsäuren", die kommerziell vertrieben werden. Man muß sich aber im Klaren sein, daß diese Stoffe zwar eine gewisse Ähnlichkeit zu natürlichen Huminstoffen haben, aber nicht mit ihnen identisch sind. Es hat sich nun gezeigt, daß Immunoassays sehr unterschiedlich robust gegen Huminsäuren sind. Die momentane Situation charakterisiert sich dadurch, daß man zwar die Robustheit feststellen, aber nur begrenzt

(empirisch) verbessern kann. Der Zusatz von BSA zum Tracer [238] oder als zusätzlicher Vorinkubationsschritt [307] kann den Einfluß von Huminstoffen zurückdrängen. Leider ist über die Mechanismen der "unspezifischen" Störungen im Detail sehr wenig bekannt.

Kürzlich wurde ein Verfahren vorgestellt, das zu einer Verbesserung der Robustheit eines ELISAs führen soll [206]. Es handelt sich um ein Verfahren, das dem hier beschriebenen "pseudohomogenen" Test ähnelt. Die Verbesserung der Robustheit ist aber wahrscheinlich nur auf eine größere Verdünnung der Probe zurückzuführen. Dies erklärt die erheblichen Empfindlichkeitseinbußen in der angesprochenen Publikation nur zum Teil. Man kann vermuten, daß entweder die Tracer- oder die Antikörper-Konzentration zu hoch gewählt wurde, um optimale Empfindlichkeiten zu erzielen.

Zum jetzigen Zeitpunkt erscheint Probenverdünnung die am allgemeinsten anwendbare und sicherste Methode zu sein, um Matrixeffekte auszuschalten. Dies zeigt jedoch mit noch größerer Deutlichkeit die Wichtigkeit der extremen Sensitivität eines Immunoassays. Nur wenn die Nachweisgrenze des Immunoassays um den Faktor 100 niedriger liegt im Vergleich zu der zu messenden Konzentration, kann die Probe vor der Messung entsprechend verdünnt werden. Hier ist leicht ersichtlich, daß Selektivität und Sensitivität auch auf diese Weise direkt miteinander verknüpft sind und nicht isoliert diskutiert werden sollten.

Man kann festhalten, daß nur robuste ELISAs im Alltag nützlich sind. Immunoassays, die diesen Kriterien nicht genügen [179], haben zu dem Schluß geführt, ELISAs würden in der Regel überbestimmte Werte liefern.

#### **4.5 "Gruppenspezifische" und "monospezifische" Immunoassays**

Es wurde wiederholt diskutiert, ob es möglich sei, "monospezifische" Immunoassays (für eine einzelne Substanz) oder "gruppenspezifische" Immunoassays (gleiche Kreuzreaktionen für alle Gruppenmitglieder) herzustellen. Beides erscheint vom heutigen Kenntnisstand aus gesehen begrenzt realisierbar.

Der hochselektive ("monospezifische") ELISA könnte m.E. durchaus erreichbar sein. Wenn man sich um die Optimierung der Bindungsstelle bemüht, entweder über geschickte Immunisierung oder nachträglich über "Nachbesserungen" (protein-engineering), so sollte es möglich sein, sehr gut bindende Antikörper für praktisch jeden gewünschten Analyten herzustellen. Eine Achillesferse bleibt aber momentan: Die Stelle im Molekül, an der der Spacer angebracht ist, bedeutet zwangsläufig ein "Loch" in der Bindungsstelle des Antikörpers. Alle Substanzen, die Reste über einen ähnlichen Spacer gebunden tragen, werden von diesem Antikörper mit hoher Kreuzreaktion erfaßt. Dies ist auch ein Fall, bei dem eine "Gruppenspezifität" hergestellt werden kann. Bezogen auf eine reale Meßsituation dürfte dies aber eher dem hochselektiven Fall entsprechen, da solche ungewöhnlichen Spacerderivate in der Natur normalerweise nicht vorkommen.

Ein echter "gruppenspezifischer" Assay ist relativ leicht herstellbar, wenn ein größerer Teil des Moleküls innerhalb der Gruppe identisch ist. Eine willkürliche Auswahl verschiedener Stoffe gleichzeitig zu detektieren, dürfte dagegen relativ schwierig sein. Ein Antikörper, der unterschiedliche Moleküle mit gleicher und hoher Affinität bindet, ist schwer vorstellbar. Zu einer willkürlichen Zusammenstellung müßte auch die Gruppe "Triazinherbizide" gerechnet werden, da es keinen breiten gemeinsamen Nenner einer räumlichen Struktur zu geben scheint. Ein Ausweg zeichnet sich nach Simulationen der Kreuzreaktion ab (siehe S. 202 ff.): Verläßt man den affinitätslimitierten Bereich, so können auch Derivate unterschiedlicher Affinitätskonstanten identische Kreuzreaktionen ergeben. Sollte sich dieser Ansatz experimentell bestätigen lassen, so sind "gruppenspezifische" Tests auch ohne identische Determinanten möglich.

#### 4.6 Verbesserung der Selektivität

Die Selektivität eines Immunoassays wird in erster Linie vom verwendeten Antikörper bestimmt. Sind also verringerte Kreuzreaktionen erwünscht, so ist der direkteste Weg, einen anderen Antikörper einzusetzen. Die Struktur des Immunogens sollte kritisch unter die Lupe genommen werden [308] und gegebenenfalls variiert werden. Falsche Immunogenstrukturen sind sicherlich die häufigste Ursache für schlechte Selektivitäten.

Bei polyklonalen Antikörpern ist es denkbar, daß Antikörper mit den optimalen Eigenschaften latent im Serum vorhanden sind, bei der entsprechenden ELISA-Konfiguration aber nicht signifikant am Reaktionsgeschehen beteiligt sind. Hier ist der Einsatz eines veränderten Tracers sinnvoll. Dies dient zur Selektion eines anderen Antikörper-Sets, das (zufällig) bessere Eigenschaften haben könnte.

Eine ungewöhnliche, aber durchaus vielversprechende Methode, um Kreuzreaktionen zu verbessern wurde von BOUTTEN et al. [309] publiziert. Die Autoren mischten einen "analytischen" Antikörper mit einem Überschuß eines Antikörpers gegen eine unerwünschte kreuzreagierende Substanz. Dieser zweite Antikörper fängt den störenden Stoff ab und senkt daher die Kreuzreaktion erheblich.

Geht man von einer festen ELISA-Konfiguration aus, so gibt es nur noch begrenzte Möglichkeiten, die Selektivität zu verbessern. In dieser Arbeit wurde z.B. die Protonierung eines kreuzreagierenden Analyten (Terbutryn) ausgenutzt, um diese Kreuzreaktion weitgehend zu unterdrücken.

Auch chemische Derivatisierungen üblicher Art könnten im Zusammenhang mit immunologischen Methoden zu einer Verbesserung der Selektivität führen. Hier wäre die Reaktivität des Moleküls unter definierten Reaktionsbedingungen ein zusätzlich selektierendes Element.

Allgemein kommen auch gängige Anreicherungs- und Clean-up-Methoden (Festphasenextraktion mit C18 o.ä., Flüssig/flüssig-Extraktion mit Lösungsmitteln) in Betracht. Doch auch hier gilt das im Abschnitt 4.4 gesagte, daß ein übermäßiger Aufwand dem Schnelltestcharakter des ELISAs widerspricht.

Eine interessante Technik wurde von SCHNEIDER et al. [310] erprobt. Die begrenzte Selektivität eines Antikörpers kann verbessert werden, indem man zusätzlich einen zweiten Antikörper unterschiedlicher Charakteristik verwendet. Die Autoren benutzen zwei Triazin-Antikörper zur Identifizierung von Triazin-Herbiziden. Eine Identifizierung im engeren Sinn ist mit einem einzelnen Antikörper (auch mit niedrigen Kreuzreaktionen) nicht möglich. Es wurde aufgrund der bekannten Kreuzreaktionen die Konzentration an Atrazin bzw. Terbutylazin berechnet. Stimmt die Konzentrationen innerhalb der Fehlergrenzen bei beiden Antikörpern überein, so konnte die Substanz als identifiziert gelten, was durch Gaschromatographie verifiziert wurde. Lagen die berechneten Konzentrationen weit auseinander, so konnte es sich nicht um die postulierte Substanz handeln.

Diese sehr einfache Methode könnte entscheidend zur Verbesserung der Verlässlichkeit von ELISA-Daten beitragen, da nur noch Ergebnisse, die bei mehreren Antikörpern konsistent sind, als gültig gewertet würden. Auch unspezifische Störungen können auf diese Weise erkannt werden.

## 5 Geschwindigkeit des Tests

### 5.1 Allgemeines

Für Routineanwendungen ist die Dauer einer analytischen Prozedur nicht ohne Bedeutung. Der Probendurchsatz hängt sehr stark von der Analysendauer ab. So ist es keineswegs gleichgültig, ob eine Inkubationsphase 24 Stunden oder nur 3 Minuten dauert. Auch die Zeitspanne, gerechnet vom Erhalt der Probe bis zum Resultat, ist von erheblicher Wichtigkeit. Bei klassischen analytischen Verfahren vergehen meist Tage oder Wochen bis ein Ergebnis auf dem Tisch des Interessenten liegt. Diese Zeitspanne ist, z.B. zur Gefahrenabwehr bei Chemieunfällen, entschieden zu lange. Bei Immunoassays ist es zumindest im Bereich des Möglichen, Tests in wenigen Minuten durchzuführen und auszuwerten. Geht man von den Ansprech- und Regenerationszeiten diverser Sensoren aus, so kann man einen schnellen Immunoassay durchaus als "quasi-online"-Verfahren bezeichnen, insbesondere da Tests auch zeitlich gestaffelt durchgeführt werden können.

## 5.2 Einflußgrößen

Wie auch im Kapitel "Simulation eines Immunoassays" diskutiert wird, ist die Meinung sehr verbreitet, daß ELISAs notwendigerweise im Gleichgewicht arbeiten und daß deshalb bestimmte "Standard-Inkubationszeiten" eingehalten werden müssen. Je nach Standpunkt werden bei kurzen Inkubationszeiten Genauigkeits-, Selektivitäts- oder Sensitivitätseinbußen befürchtet. In dieser Arbeit wurden diese Aspekte besonders intensiv untersucht - mit überraschenden Ergebnissen: Kurzinkubationen haben kaum je negative Effekte. Im schlimmsten Fall treten bei erheblich beschleunigtem Testablauf keine Verbesserungen der Empfindlichkeit oder der Kreuzreaktionen auf.

Der erste Schritt eines Immunoassays, das Coaten, kann sehr gut automatisiert und auch schon vom Hersteller des Tests durchgeführt werden. Die Stabilisierung ist zwar ein technologisch heikles, aber durchaus schon teilweise gelöstes Problem (siehe S. 235). Insofern muß sich der Anwender um das Coating keine Gedanken mehr machen, es tritt auch nicht mehr in seiner Zeitkalkulation auf.

Der zweite Schritt ist die Aufgabe der Proben und der Standards. Diese Zeitspanne ist in erster Linie vom Geschick und der Ausrüstung des Anwenders abhängig. Anschließend ist die Vorinkubation der Proben und Standards an der Reihe: Es hat sich gezeigt, daß wesentlich kürzere Zeiten wie üblich notwendig sind.

Der vierte Schritt bezieht sich auf die Tracerinkubationszeit: Auch sie kann sehr kurz gehalten werden - ohne Qualitätseinbußen. Der nachfolgende Waschschrift kann zwar kurz ausfallen, es darf aber nicht an Gründlichkeit fehlen<sup>14</sup>.

Der letzte Schritt, die Substrat-Entwicklung, kann nur begrenzt verkürzt werden, da ein ausreichendes Signal abgewartet werden muß. Dieser Prozeß ist jedoch leicht beeinflussbar: Durch eine geschickte Auswahl des Tracers, des Antikörpers und deren Konzentration können Entwicklungszeiten von 1 - 2 Minuten problemlos erreicht werden. Der Entwicklung kann sich noch ein Stopp-Schritt anschließen, der nur von der Pipettiergeschwindigkeit abhängt. Will man den Stopp-Schritt weglassen, so kann man eine kinetische Messung der chromogenen Reaktion oder eine Einpunktmessung der ungestoppten Substratlösung durchführen.

---

<sup>14</sup> Zu oberflächlich gewaschene Platten sind eine häufige Ursache von mißlungenen Immunoassays.

### 5.3 Applikationen

Alle Produkte, die sich an eine Zielgruppe wenden, die nicht als geschultes Laborpersonal eingestuft werden kann, müssen in einer sehr begrenzten Zeitspanne ein Resultat liefern. Zu diesen Produkten gehören z.B. Teststäbchen oder andere Schnelltests. Doch auch die Anwender im üblichen analytischen Umfeld wissen eine Verkürzung der Testdauer zu schätzen. Und nicht zuletzt die Entwicklung von Immunosensoren stagniert ohne die gezielte Anwendung von kinetischen Überlegungen zur Beschleunigung der Meßzyklen.

## 6 Simulation eines Immunoassays

### 6.1 Allgemeines

Simulationen können für viele unterschiedliche Zwecke durchgeführt werden. Eine häufige Motivation ist die Optimierung von Versuchsbedingungen [311][312]. Hier stand jedoch eher die Aufklärung von empirischen Phänomenen und experimentell schwierig zu klärenden Fragen im Vordergrund.

Bei Enzymimmunoassays wird oft ungeprüft davon ausgegangen, daß sich die Reaktionspartner am Ende des Tests im Gleichgewicht befinden und daß daher das Massenwirkungsgesetz eine adäquate Beschreibung darstellt [191][313]. Von MCPHERSON und ZETTNER [314] wurde eine geschlossene Lösung der Assoziationsreaktion (zweiter Ordnung) von Ligand und Bindungsmolekül vorgestellt, die insbesondere die Vorhersage der notwendigen Inkubationszeit bis zum Gleichgewicht oder bis zu einer definierten prozentualen Bindung erlaubt.

Viele mathematische Ansätze bzw. Simulationen wurden zwar detailliert ausgeführt, die kritischen Faktoren wie Ungleichgewicht, Waschschritte, Verdünnung durch Zusatz von Reagenzien, Unterschiede zwischen Analyt und Tracer etc. wurden jedoch nicht oder nur fragmentarisch berücksichtigt [315]-[319]. Entsprechend mäßig sind die Übereinstimmungen von Experiment und Simulation. Durch eigene Versuche und durch Hinweise anderer Experimentatoren [320] wurde jedoch bald klar, daß sich ein Gleichgewicht in ELISAs nur in Ausnahmefällen einstellt. Normalerweise sind die Vorgänge (den Tracer betreffend) so langsam, daß es Tage dauern kann, bis ein Gleichgewicht annähernd erreicht wird. Voruntersuchungen hatten gezeigt, daß sich die Testcharakteristik in vielen Aspekten zeitabhängig ändert. Deshalb erschien es wünschenswert, zumindest die Formal-Kinetik eines typischen Triazin-ELISAs komplett zu beschreiben. Darauf aufbauend wäre es möglich, den Testablauf numerisch zu simulieren und grundsätzliche Fragen der wichtigen Einflußparameter zu klären, auch wenn die Variation bestimmter Parameter in der Realität nicht (gezielt) möglich sein dürfte.



Man kann durch Simulationen auch Testkonfigurationen einer Überprüfung unterziehen, die aus technischen Gründen (noch) nicht realisiert werden konnten. Sehr hilfreich kann ein Simulationssystem zur Fehlersuche sein: Da bei einer Simulation, anders als im realen Test, jede Konzentration zu jedem Zeitpunkt genau angebbbar ist, können unerwartete Effekte oft sehr schnell einer einfachen Interpretation zugeführt werden.

## 6.2 Kinetische und mathematische Grundlagen

Ausgehend von Angaben in der Literatur wurde angenommen, daß sich ein ELISA mit relativ einfachen Geschwindigkeitsgesetzen beschreiben läßt. Diese Geschwindigkeitsgesetze wurden als erste Näherung aus den stöchiometrischen Gleichungen hergeleitet. Hierbei muß betont werden, daß in diesen Simulationen von monovalenten Antikörpern ausgegangen wurde, d.h. die Antikörperkonzentration ist identisch mit der Konzentration der Bindungsstellen. Nachträglich kann diese Vereinfachung gut begründet werden, da es in keinem Fall Hinweise auf kooperative Effekte gegeben hat. Dies ist bei kleinen Analyten (Haptenen) auch eher unwahrscheinlich, da die Fernwirkung eines so kleinen Moleküls nur sehr gering ist. Das gesamte Modell basiert auf einer homogenen Verteilung der Reagenzien: Z.B. sind Effekte, die durch die Immobilisierung von Antikörpern hervorgerufen werden, nicht explizit berücksichtigt worden.

Differentialgleichungssysteme lassen sich nur in einfachen Fällen geschlossen lösen. Alle anderen Anwendungsbereiche müssen auf numerische Näherungsverfahren zurückgreifen. Die direkteste Methode, die auch hier verwendet wurde, geht von der Idee aus, Differentiale als Differenzen-Quotienten auszudrücken und die Differenz sehr klein zu machen. Im Grenzfall der infinitesimalen Differenz geht der Differenzenquotient in das Differential über. Insofern ist der mathematische Ansatz recht einfach: Es werden die Gleichungen der Geschwindigkeitsgesetze benutzt sowie einige Erhaltungsgleichungen. Sodann werden die Startwerte gesetzt und gewisse Randbedingungen festgelegt (z.B. keine negativen Konzentrationen). Dann wird in winzigen Zeitinkrementen der Fortgang der Reaktion berechnet und protokolliert.

Schwieriger ist hier schon die möglichst realistische Simulation aller Testschritte, wobei auch Verdünnungen durch zugesetzte Reagenzien berücksichtigt wurden. Waschschrte wurden als sehr effektiv angenommen: Die Konzentration freier Komponenten wurde sofort null gesetzt. Es wurde bei jedem Simulationslauf ein zweidimensionaler Variationsarray abgearbeitet, wobei die erste Dimension einer üblichen Triazin-Eichkurve entspricht und die zweite einem beliebigen, variierten Parameter (z.B. der Tracerkonzentration).

Die simulierten Eichkurven wurden im Anschluß an die 4-parametrische Gleichung gefittet, um die Parameter A, D, C und B zu erhalten. Die Fitting-Routine wurde mit einem modifizierten Algorithmus des "steilsten Abstiegs" realisiert [321].

### 6.3 Durchführung

Das Kernprogramm für die Simulation und des Fittings wurde in Turbo-Pascal 6.0 (IBM-kompatibler PC unter DOS) programmiert. Sowohl die Initialisierungslisten als auch die Ergebnisdateien wurden im ASCII-Format angelegt, was eine einfache Weiterverarbeitung zur graphischen Darstellung ermöglicht. Die Berechnung von 10 Eichkurven à 20 Punkten dauert bei einem Zeitinkrement von 0.025 s und einer Testdauer von 18 min (d.h. 43200 Zeitschritten) an einem 386er (33 MHz) Personal-Computer mit numerischem Coprozessor ca. 43 Minuten. Hierin eingeschlossen ist die Berechnung der Parameter der 4-parametrischen Gleichung.

In Abb. 17 ist der zeitliche Konzentrationsverlauf eines einzelnen Eichpunktes dargestellt. Bei der Zugabe des Analyten ( $t=1$  min) erfolgt eine schnelle Gleichgewichtseinstellung. Nachdem der Tracer hinzugefügt wurde ( $t=6$  min) ist ein "Knick" in drei Kurven zu erkennen, der auf den Verdünnungseffekt des hinzugefügten Reagenzes zurückzuführen ist. Der Tracer bindet wesentlich langsamer und erreicht auch nach 10 min Inkubationszeit kein Gleichgewicht. Nach dem Waschen ( $t=16$  min) sind kräftige Analytverluste zu erkennen (logarithmische Konzentrationsachse!), die sich jedoch nicht mehr auf das Ergebnis des Tests auswirken. Es werden wieder deutlich mehr Antikörperbindungsstellen frei. Das Resultat besteht in erster Linie aus der Konzentration des Tracerkomplexes (YT) am Ende des Tests.

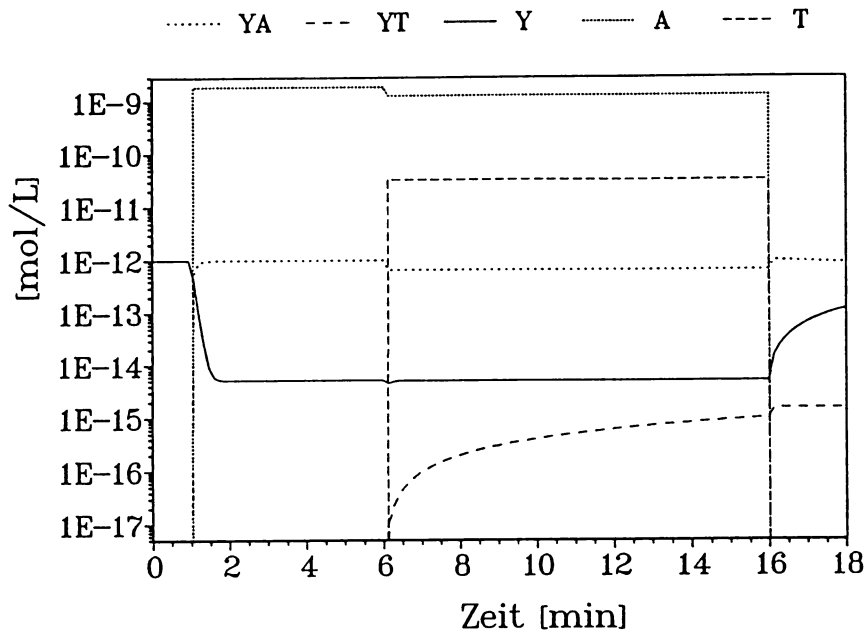
Die enzymatische Entwicklung wurde nicht in die Simulation integriert, da sie unter geeigneten Bedingungen ausgeführt nur zu einem linearen Proportionalitätsfaktor zwischen der Konzentration des Tracerkomplexes und der Absorption führt. Es ist leicht einzusehen, daß derartig komplexe Konzentrationsverläufe nur schwer ohne numerische Simulation quantitativ eingeschätzt werden können. Durch krasse Vereinfachungen, z.B. Annahme einer Gleichgewichtssituation, dürfte nur in wenigen Fällen eine richtige Prognose möglich sein.

### 6.4 Kontrollen

Kontrollen sind bei komplexen Programm-Systemen unerlässlich, um Programmierfehler aufzuspüren. Nun ist es sehr aufwendig, einen synthetischen Datensatz unabhängig von diesem Programm zu erzeugen. Die Tests wurden weitgehend darauf beschränkt, unterschiedlichste ELISA-Konfigurationen zu untersuchen und die Ergebnisse auf Plausibilität zu prüfen. Dies kann bei graphischer Darstellung der Resultate sehr effektiv durchgeführt werden.

In einzelnen Fällen konnten jedoch auch konkrete Werte einer Überprüfung unterzogen werden: So muß im Falle der Bestimmung einer Affinitätskonstante durch Tracer- oder Antikörperverdünnung die in der Initialisierungsdatei festgelegte Affinitätskonstante exakt reproduziert werden, was mit sehr guter Genauigkeit gelingt (siehe auch Abb. 41). Die Abweichung vom erwarteten Wert war kleiner als 0.00005 %. Dies entspricht einer Fehler-

abschätzung über alle Programme, also Simulation und Kurvenfitting. Auch lassen sich die eingesetzten Konzentrationen und deren Veränderung bei Zugabe anderer Reagenzien (Verdünnung!) gut kontrollieren. Die durch das Kurvenfitting erhaltenen Parameter können laufend überwacht werden, da jeder Parameter eine (graphisch sichtbare) Bedeutung aufweist.



**Abb. 17: Beispiel einer Immunoassay-Simulation.** YA Antikörper-Analyt-Komplex, YT Antikörper-Tracer-Komplex, Y Antikörper, A Analyt, T Tracer, Gesamtdauer: 18 min, Zeitinkrement: 0.005 s,  $[Y]_0 = 10^{-10}$  mol/L,  $[T]_0 = 10^{-10}$  mol/L,  $[A]_0 = 5 \cdot 10^{-10}$ ,  $k_1 = 10^7$  L/mol·s,  $k_{-1} = 10^{-5}$  1/s,  $k_2 = 10^8$  L/mol·s,  $k_{-2} = 10^{-2}$  1/s, Analytzugabe:  $t = 1$  min, Tracerzugabe:  $t = 6$  min, Waschen:  $t = 16$  min, Volumen: Analyt 200  $\mu$ L, Tracer 100  $\mu$ L, Endvolumen 200  $\mu$ L.

## 7 Synthesen von Immunoassay-Komponenten

### 7.1 Allgemeines

Synthesen sind ein zentraler Punkt in der Entwicklung von Immunoassays. Trotz der weit verbreiteten Abneigung, viel Energie in die Ausarbeitung einer etwas komplexeren Synthese zu stecken, zeichnet sich immer deutlicher ab, daß "Hochleistungsimmunoassays" nicht mit Eintopf-Standardsynthesen zu erreichen sind. Die sehr häufig anzutreffende "Synthesevermeidungsstrategie" [322] rächt sich in einer nicht mehr zu korrigierenden Weise: Es werden Antikörper erhalten, die durchaus gute Bindungseigenschaften zu der verwendeten Standardchemikalie haben, nicht jedoch zwangsläufig auch zum gewünschten Analyten. Bei vielen "mäßig" empfindlichen Immunoassays, bei denen von den Autoren Brückenerkennung, Polyklonalität, nicht optimale Kopplungsdichten oder Immunisierungsprotokolle als Problem genannt werden, sind m.E. in Wirklichkeit strukturell falsche Immunisierungen Ursache der

Mißerfolge. Zwangsläufig ergibt sich daraus, daß nachträgliche, auch sehr mühevoll Optimierungsprozeduren nicht mehr helfen, diese Mängel auszugleichen.

Dagegen erscheinen Anstrengungen, mit sehr gezielt "designten" Haptenen das Immunsystem zur Herstellung des gewünschten Antikörpers zu bewegen, oft erfolgreich. Es muß schon verwundern, daß oft ziemlich seltsame Erklärungsversuche für mißlungene Immunisierungen herangezogen werden und das Naheliegende, die Struktur des Haptens oft übersehen wird.

Auch die Reinigung der verwendeten Komponenten kann nicht wichtig genug genommen werden. Immunologisch aktive Verunreinigungen können sehr unangenehme Folgen für die Sensitivität und Selektivität eines Tests haben. Die hohe Selektivität eines Antikörpers kann nur genutzt werden, wenn mit reinen Testkomponenten gearbeitet wird. Es dürfte einleuchtend sein, daß ein Antikörpergemisch, das mit Hilfe eines Immunogengemischs erzeugt wurde und mit einem Tracergemisch im Test umgesetzt wird, keine einzelne Substanz detektieren kann.

## 7.2 Synthesen der Triazinderivate

Die Basischemikalie zur Herstellung von Triazinherbiziden<sup>15</sup> [323][324] ist das Cyanurchlorid (2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin) [325][326], einem Trimerisationsprodukt von Chlorcyan. Cyanurchlorid wird in einer Menge von über 100.000 Tonnen pro Jahr (Weltproduktion) hergestellt, wobei mehr als 2/3 zur Synthese von Herbiziden verbraucht wird. Weitere Anwendungen liegen im Bereich der Fungizide, Farbstoffe, optische Aufheller, Polymere, Weichmacher und Vernetzer. Es ist eine in organischen Lösungsmitteln gut, in Wasser schwer lösliche, übelriechende Substanz, welche mit Nucleophilen [327][328] aller Art [329]-[332] reagiert. Da drei Chloratome zur Substitution zur Verfügung stehen, lassen sich unzählige Derivate relativ einfach herstellen. Besonders günstig ist die Tatsache, daß die drei Chloratome unter geregelten Reaktionsbedingungen sequentiell [333] substituiert werden können - ein Problem mit Mehrfachsubstitution oder Nebenreaktionen gibt es kaum. Die Steuerung erfolgt in erster Linie durch die Temperatur: Die erste Substitution erfolgt schon unter 0°C. Der zweite Schritt kann bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Das dritte Chloratom ist nur bei deutlich erhöhter Temperatur zugänglich (ca. 80 °C). Diese Angaben sind nur als Faustregel (ähnlich von FIERZ-DAVID, zit. in [326]) geeignet - die Reaktivität wird selbstverständlich durch die Art des Nucleophils, das Lösungsmittel und die schon vorhandenen Substituenten beeinflusst. Triazinderivate sind oft gut kristalline Substanzen und lassen sich daher problemlos reinigen.

---

<sup>15</sup> Der Stammkörper dieser Verbindung, das s-Triazin, ist chemisch instabil und kann nur unter hohem Aufwand synthetisiert werden. Durch Einwirkung von Nucleophilen (auch Luftfeuchtigkeit) tritt leicht Zersetzung unter Ringspaltung ein. Dagegen ist das s-Triazin thermisch überraschend stabil und kann über Natrium destilliert werden.

In einem Fall wurde nicht das Cyanurchlorid, sondern das Methylmercaptodichlortriazin (MDT) [326] als Ausgangsstoff verwendet. Diese Verbindung ist als technisches Produkt (Zwischenprodukt z.B. zur Ametrynsynthese [334]) erhältlich.

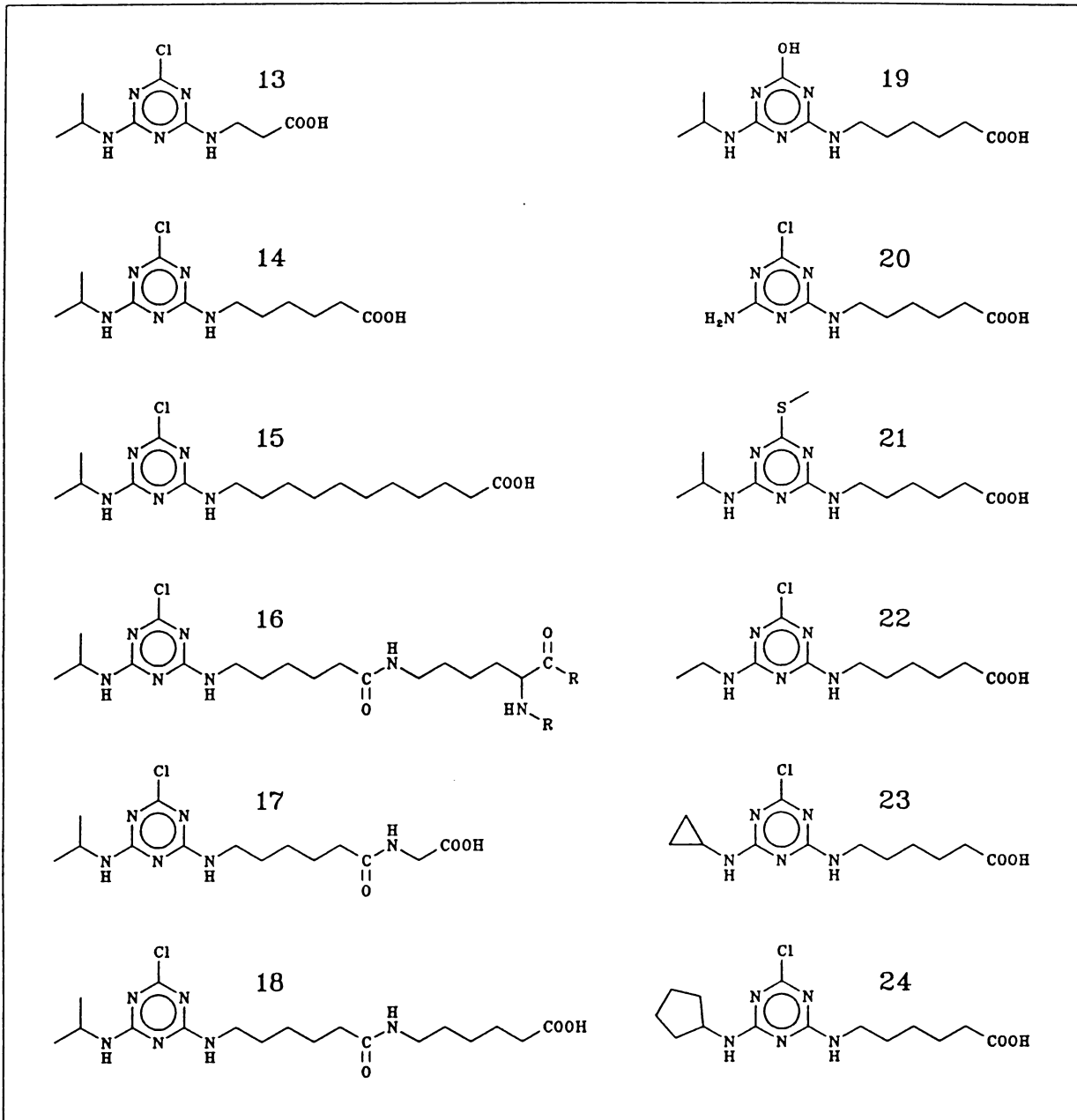
Es gibt einige Möglichkeiten Triazinsynthesen durchzuführen: So kann man die Synthese in homogener Lösung oder als Zweiphasen-Reaktion (flüssig/flüssig) durchführen. Auch Reaktionen als Suspension sind (besonders im technischen Maßstab) möglich.

Problematisch ist es, ein geeignetes Lösungsmittel für alle Reaktionskomponenten zu finden. So sind Aminocarbonsäuren (Spacervorstufe) fast nur in wässrigen Medien gut löslich, wogegen viele Triazine (incl. Cyanurchlorid) nur in organischen Lösungsmitteln ausreichend löslich sind. So hat sich gezeigt, daß Zweiphasen-Reaktionen in tert-Butyl-Methyl-Ether/Wasser oder Toluol/Wasser für Laborsynthesen wohl am allgemeinsten anwendbar sind.

Eine weitere Entscheidung muß hinsichtlich der zum Abfangen der Salzsäure verwendeten Base getroffen werden. Die Auswahl ist insofern unkritisch, da viele Basen prinzipiell geeignet sind: Alkalihydroxide, -carbonate und -hydrogencarbonate, sowie primäre, sekundäre und tertiäre Amine [193]. Bei billigen (basischen) Reaktanden ist es wohl am einfachsten, eine doppelte Menge des Nucleophils einzusetzen. Hier kann man in homogener Phase arbeiten und das als Nebenprodukt anfallende Ammoniumsalz einfach abfiltrieren. In diesem Fall ist es nicht anzuraten, ohne Trennung weiterzuarbeiten, da das Ammoniumsalz bei weiteren Schritten wieder als nucleophiles Amin remobilisiert werden kann. Bei teuren Aminen ist es günstig, als Base z.B. Triethylamin zu verwenden, das wiederum als Salz gut abgetrennt werden kann.

Es hat sich bewährt, homogene Schritte vor heterogenen durchzuführen: Dies legt die Reihenfolge der Einführung der Substituenten oft schon fest. Aminocarbonsäuren sind als Betaine weder besonders nucleophil, noch als Base geeignet. In diesem Fall muß immer mit einer zusätzlichen Base gearbeitet werden. Da Aminocarbonsäuren in der Regel in Wasser gelöst werden müssen, ist es nicht von Nachteil, eine billige Base wie Natriumhydrogencarbonat o.ä. zu verwenden. Es sollte bedacht werden, daß bei der Einführung einer wässrigen Phase auch Hydrolyse [335] als Nebenreaktion auftreten kann: Daher sollten unnötig lange Reaktionen unter stark basischen Bedingungen sowie hohen Temperaturen vermieden werden. Vorteilhaft ist jedoch, daß Hydrolyseprodukte aufgrund ihrer Schwerlöslichkeit oft recht einfach abgetrennt werden können.

In den folgenden Abbildungen sind die Strukturen wichtiger Triazinderivate dargestellt, deren Synthese und Anwendung in dieser Arbeit beschrieben wird.



**Abb. 18: Triazin-Derivate.** 13 *i*-Pr/Cl/C3, 14 *i*-Pr/Cl/C6, 15 *i*-Pr/Cl/C11, 16 *i*-Pr/Cl/C6-Lys(Protein), 17 *i*-Pr/Cl/C6-C2, 18 *i*-Pr/Cl/C6-C6, 19 *i*-Pr/OH/C6, 20 H/Cl/C6, 21 *i*-Pr/SMe/C6. 22 Et/Cl/C6, 23 *c*-Pr/Cl/C6, 24 *c*-Pentyl/Cl/C6.

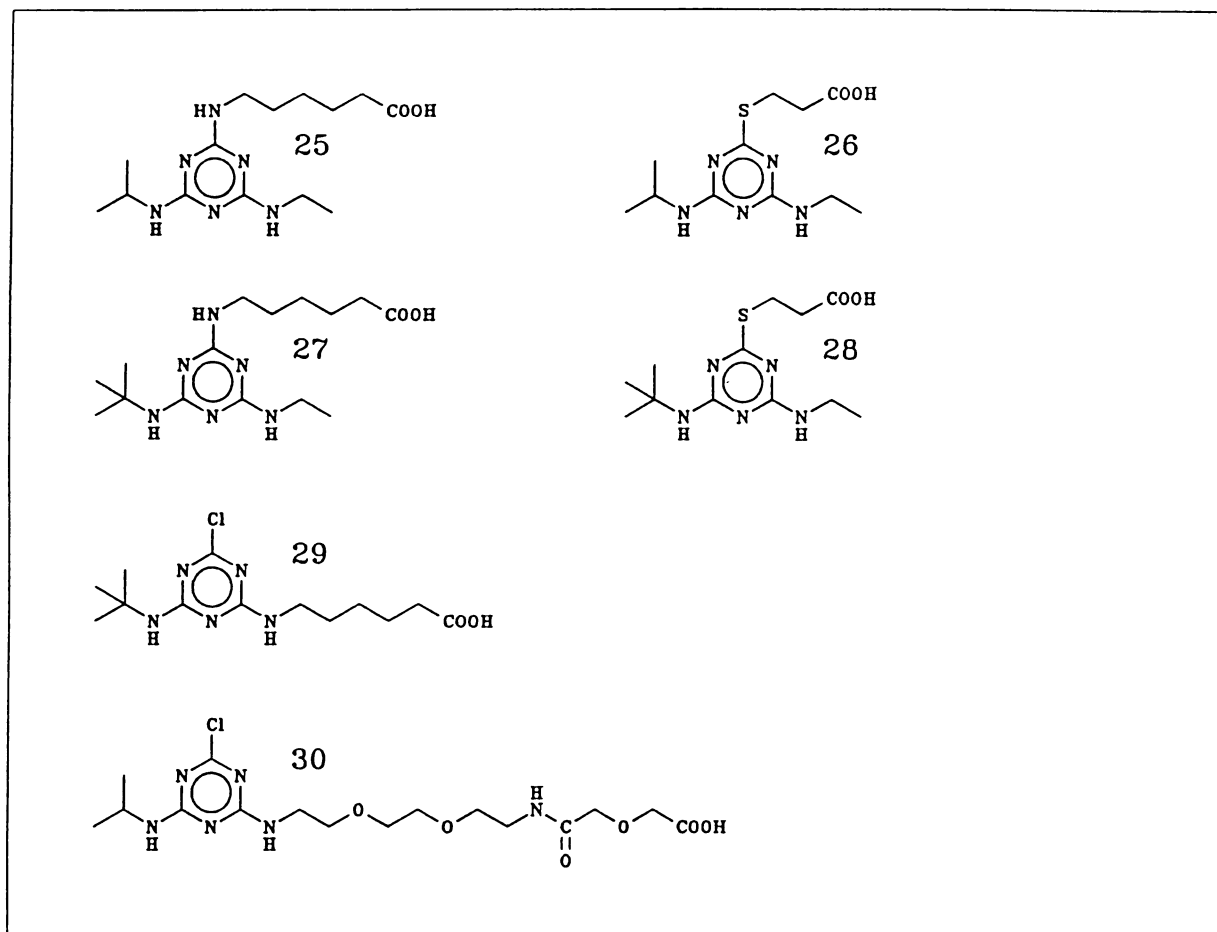


Abb. 19: Triazin-Derivate. 25 *i*-Pr/Et/C6, 26 *i*-Pr/Et/MPS, 27 *t*-Bu/Et/C6, 28 *t*-Bu/Et/MPS, 29 *t*-Bu/Cl/C6, 30 *i*-Pr/Cl/EDA-DGS.

### 7.3 Aktivierung des Haptens

Nicht ohne Grund ist die Verwendung von N-Hydroxysuccinimidestern (NHS-Estern) sehr populär, die auf unterschiedliche Weise synthetisiert werden können. Als wichtigste Methode ist die Carbodiimid-Methode zu nennen [336][337]. Es wird die Carbonsäure mit Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt und mit NHS in einen NHS-Ester verwandelt. Da sowohl das Carbodiimid als auch der als Nebenprodukt entstehende Dicyclohexylharnstoff schwer wasserlöslich sind, ist eine Reinigung des Esters z.B. durch Umkristallisation kaum zu umgehen, um störende Niederschläge bei der Kopplung zu vermeiden. Eine bessere Variante stellt daher die Verwendung von wasserlöslichen Carbodiimiden (EDC) dar, die vor der Kopplung nicht vollständig abgetrennt werden müssen (Abb. 19). In dieser Arbeit wurde aus dieser Methode eine Standardvorschrift entwickelt, die sich in vielen Fällen erfolgreich anwenden ließ [338]-[340]. Als weitere Methode ist ein Weg über Disuccinimidylcarbonat (DSC) beschrieben worden [341]-[343]. Diese Methode wurde getestet und kann als vergleichbar mit Carbodiimidmethoden angesehen werden.

Ein entscheidender Nachteil ist die Verwendung von Pyridin als Base, die den pH-Wert bei der Kopplung unkontrolliert beeinflussen kann. Für besonders schwer lösliche Haptene kommt ein Reagenz von STAROS [344] in Frage, der N-Hydroxysulfosuccinimid als besser wasserlöslichen Ersatz von NHS verwendet.

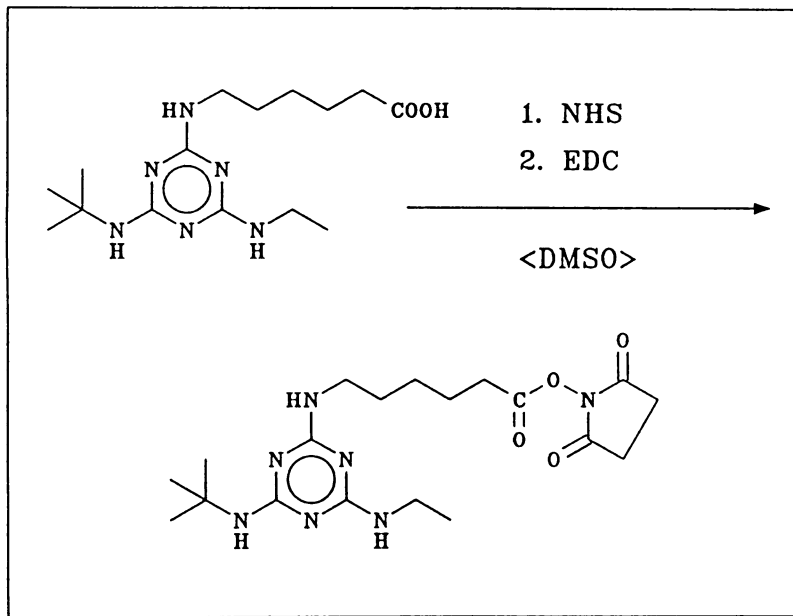


Abb. 20: Synthese eines NHS-Esters mit EDC.

Unabhängig von den vorhandenen Lysinresten können Glycoproteine auch über ihre Kohlenhydrat-Ketten derivatisiert werden. Hier steht die Oxidation mit Periodat [345] unangefochten im Vordergrund. Diese Glycolspaltung [346] verläuft im wässrigen Milieu bei niedrigen Temperaturen schnell und relativ sauber. Überschüssiges Periodat wird mit Ethylenglycol vernichtet. Die entstehenden Aldehydgruppen können mit verschiedensten Reagenzien umgesetzt werden. Am bekanntesten ist die Reaktion mit Aminen zu Schiffsbasen, die jedoch labil sein können. Sie sollten daher mit Natriumborhydrid reduziert und somit stabilisiert werden. Diese Reduktion stellt aber eine durchaus drastische Reaktion dar, die die Aktivität des Enzyms gefährdet. Auch ist die pH-Kontrolle durch die stark basischen Eigenschaften des Reagenzes schwierig. Vorteilhaft kann sein, daß der Grad der Aktivierung in weitem Rahmen veränderbar ist und somit sehr unterschiedliche Kopplungsdichten realisiert werden können. Eine modernere Variante stellt die Reaktion von Aldehyden mit Hydraziden dar [347]. Die spontan gebildeten Hydrazone sind ausreichend stabil und müssen nicht mit Reduktionsmitteln behandelt werden [348]. Zudem ist der niedrige  $pK_a$  (2.6) von Hydraziden günstig, da bei üblichen pH-Werten keine Protonierung erfolgt.

Spezielle Aktivierungsmethoden gehen von reaktiven Triazinderviaten aus. Da diese Haptene keinen Spacer besitzen, sind die damit erhaltenen Antikörper oft wenig empfindlich. Diese Methoden werden hier der Vollständigkeit halber erläutert, insbesondere, da einige der in dieser Arbeit charakterisierten Antikörper mit Konjugaten dieser Art gewonnen wurden:



Die bekannteste Methode "Atrazin-Konjugate" herzustellen, ist die Ametrynsulfoxid-Methode (Abb. 21). Ausgehend von Ametryn (Thiomethyl-Derivat des Atrazins) wird eine Oxidation mit MCPBA (meta-Chlorperbenzoesäure) durchgeführt. Das Ametrynsulfoxid wird durch präparative Dünnschichtchromatographie von Nebenprodukten befreit und mit dem betreffenden Protein in wässrigem Milieu (Carbonat-Puffer) umgesetzt. Es erfolgt eine nucleophile Substitution am Ring, wobei der Methylsulfoxid-Rest als Abgangsgruppe fungiert.

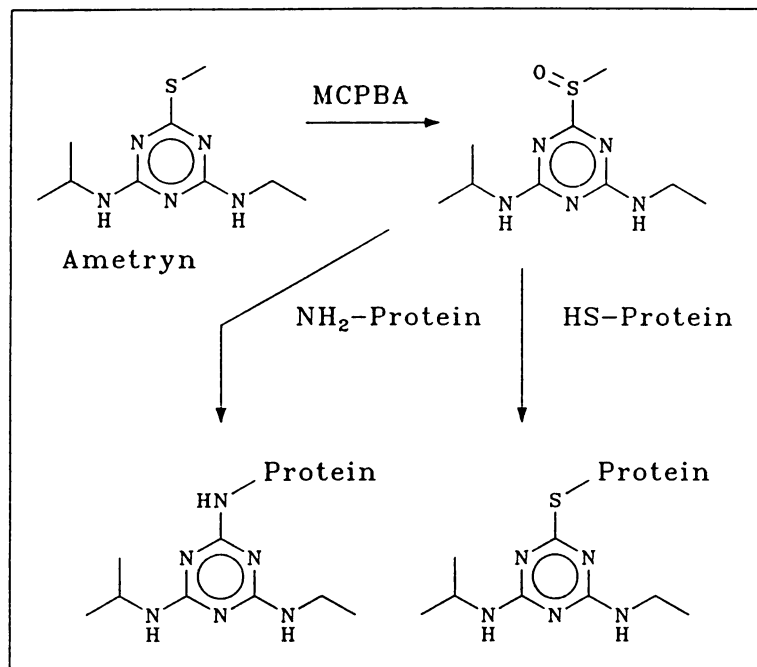


Abb. 21: Synthese von Ametrynsulfoxid-Konjugaten.

Es wird allgemein angenommen, daß bevorzugt SH-Gruppen mit Ametrynsulfoxid reagieren [349], was wieder zu einem Schwefelsubstituenten am Ring führt. Andererseits besitzt z.B. BSA zwar viele freie Aminogruppen, aber nur ein freies Cystein [350]. Insofern dürfte auch ein erheblicher Anteil des Ametrynsulfoxids zu Aminoderivaten abreagieren. Die Reinigung des Konjugats erfolgt mittels Gelchromatographie.

Eine noch direktere Methode wurde von GIERSCHE [201] angewendet. Er setzte das Zwischenprodukt der Atrazinsynthese 2,4-Dichlor-6-isopropylamino-s-triazin (Abb. 22) unmittelbar mit Proteinen um. Dieses Derivat hat ein reaktives Chloratom und reagiert bei Raumtemperatur mit vielen Nucleophilen, so auch mit  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins und SH-Gruppen des Cysteins.

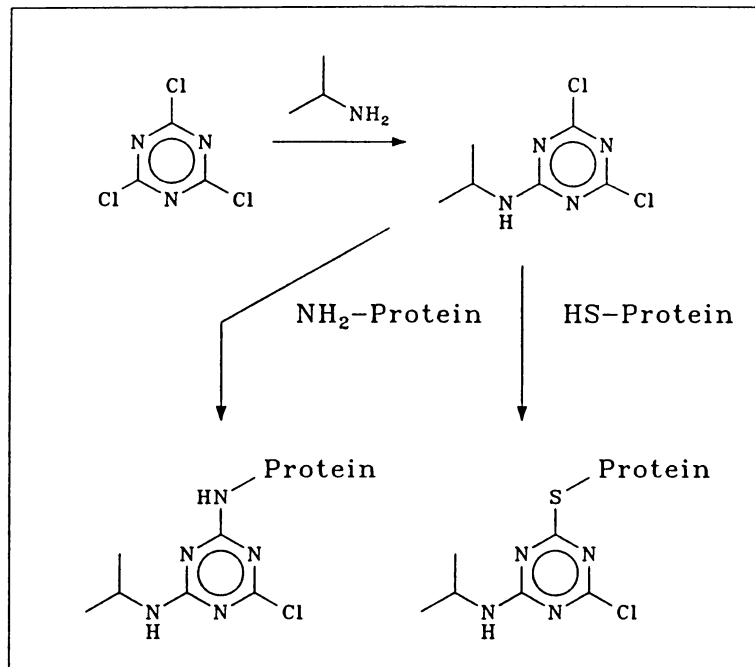


Abb. 22: Synthese von 2,4-Dichlor-6-isopropylamin-s-triazin-Konjugaten.

#### 7.4 Kopplung des Haptens

Die Kopplung eines Haptens an ein Enzym bzw. Protein kann mit unzähligen Methoden durchgeführt werden. Übersichtsartikel wurden z.B. von MEANS und FEENEY [351] oder BRINKLEY [352] publiziert.

Kopplungen mit Proteinen [353] unterliegen starken Restriktionen: So müssen die Reaktionen mit hoher Ausbeute, ohne störende Nebenprodukte sowie bei Raumtemperatur (oder darunter) in wässrigem Medium bei fast neutralen pH-Werten ablaufen. Kopplungsfähig sind in Proteinen vorwiegend reaktive Aminosäurereste [354][355]. N-terminale Aminogruppen sind oft nicht zugänglich oder, wie im Fall der Peroxidase als Pyroglutamat-Rest blockiert. In Frage kommen also z.B. Lysin- oder Cysteinreste. Thiole sind sehr reaktionsfähig und reagieren unter bestimmten Bedingungen sehr selektiv. Bedauerlicherweise sind freie SH-Gruppen in Proteinen eher selten und müssen daher meist erst indirekt durch Umwandlung eines Lysinrests oder durch Spaltung von Disulfidbrücken eingeführt werden. In der Praxis sind daher Lysinreste die einfachste und direkteste Weise ein Protein zu derivatisieren, zudem die gebildeten Amide chemisch sehr stabil sind. Die Aminogruppen werden in der Regel mit aktivierten Carbonsäurederivaten umgesetzt (Gemischte Anhydride oder Aktivierte Ester).

Die Kopplung von NHS-Estern mit Proteinen erfolgt in neutralen bis basischen Puffern, wobei mit 0.1 M Borax- oder Natriumhydrogencarbonatpuffer gute Ergebnisse erzielt worden sind. Ein 10 - 100facher Überschuss an Hapten ist bei Peroxidase anzuraten, um eine unvoll-

ständige Aktivierung und Hydrolyse im Kopplungspuffer auszugleichen. Bei anderen Enzymen muß ein Kompromiß zwischen Kopplungsausbeute und Kopplungsdichte gefunden werden, da oft sehr viele (zu viele) Lysinreste derivatisierbar sind.

Wirklich problematisch sind sehr schlecht wasserlösliche Haptene [356]. Wenn die Löslichkeit einen kritischen Wert unterschreitet, wird auch bei ausreichendem Zusatz von aktiviertem Hapten keine Kopplung eintreten, da die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen löslichem Enzym und dem als Feststoff ausgefallenen Hapten nicht genügend hoch ist. Hier sind neue Methoden zur Herstellung von löslichen Haptenen erforderlich. Die Synthese eines hydrophilen Spacers (siehe S. 220) bietet hier einen möglichen Ausweg. Eine bequemere und allgemeinere anwendbare Lösung wäre ein hydrophilerer Alkohol als Ersatz für N-Hydroxysuccinimid. Da die bisher auf diesem Gebiet gemachten Fortschritte noch nicht zu einem allgemeinen Durchbruch geführt haben, dürfte hier noch einige Optimierungsarbeit bzgl. Struktur und Reaktionsbedingungen zu leisten sein.

### 7.5 Synthese von hydrophilen Derivaten

Die Synthese von hydrophilen Spacern begründet sich aus verschiedenen Motivationen. Die erste bezieht sich auf die Wasserlöslichkeit der mit diesen Spacern versehenen Haptene, was die Kopplung verbessern kann. Bei üblichen Spacer-Derivaten werden oft so schlechte Wasserlöslichkeiten erhalten, daß die Kopplung im wässrigen Medium nicht mehr effektiv durchgeführt werden kann. Reaktionen mit Enzymen in nichtwässrigen Medien werden zwar gelegentlich in Spezialfällen durchgeführt, können jedoch keineswegs als Routine-Methode empfohlen werden. Daher erscheint es wesentlich direkter, die Spacer-Derivate so gut wasserlöslich zu machen, daß ein Umstieg auf Lösungsmittel nicht notwendig wird.

Die zweite Motivation ist die Unterdrückung einer "Brücken-Erkennung" (Spacer Recognition, Bridge Binding) des Tracers. Da aus sterischen Gründen der völlige Verzicht auf einen Spacer negative Effekte zeigt, bietet sich hier an, bei der Immunisierung einen hydrophoben, beim Tracer einen hydrophilen Spacer zu verwenden oder umgekehrt.

Die dritte Motivation ergibt sich aus der Erfahrung unterschiedlicher Immunisierungsstrategien: Es hat sich bisher gezeigt, daß lange Spacer gute Antikörper ergeben. Obwohl gegenteilige Annahmen sehr verbreitet sind, erscheint die Gefahr eines Zurückfaltens des Spacers eher gering. Lange Spacer ( $> C_6$ ) sind aus Gründen schlechter Handhabbarkeit (besonders Löslichkeit) nur sehr begrenzt eingesetzt worden. Wenn geeignete hydrophile Spacerderivate zur Verfügung stehen, können völlig neue Regionen der sterischen Zugänglichkeit erschlossen werden. Diese Vorteile können sich auch auf die Herstellung optimal bindender Tracer auswirken.

## 7.6 Reinigung

Die Reinheit [357] ist bei Anwendungen im Immunoassay-Bereich wesentlich wichtiger als eine hohe Ausbeute. Dies gilt sowohl für die Synthese der Haptene (bzw. Vorstufen) als auch für Tracersynthesen und in gewissem Ausmaß auch für die Antikörper selbst. Dies bedingt bei Synthesen zwangsläufig, daß die Optimierung der Reaktionsbedingungen in eine andere Richtung getrieben werden muß: Möglichst leichte Abtrennung der Nebenprodukte und Anwendung möglichst effektiver Reinigungsschritte. Neben chromatographischen Methoden, die unter präparativen Bedingungen zur Trennung sehr ähnlicher Verbindungen oft nicht leistungsfähig genug sind, sollte man an strategisch günstigen Positionen im Syntheseweg "chemische" Trennschritte einbauen. Hier ist an allererster Stelle das "Ausethern" von Carbonsäuren zu nennen, die oft in einem Schritt zu sehr reinen Produkten führt.

Nach der eigentlichen Kopplung (Enzym-Tracer) muß sich ein Reinigungsschritt anschließen, der alle ungekoppelten Haptene vom Konjugat abtrennen soll. Ursprünglich wurden hier vorwiegend Dialyseverfahren angewendet, die jedoch langsam und nicht sehr effektiv sind. Wesentlich praktischer scheint die Anwendung von handelsüblichen Entsalzungssäulen, die als kurze gelchromatographische Säulen die Trennung zwischen Tracer (große Moleküle) und Nebenprodukten (kleine Moleküle) problemlos und mit hoher Effizienz durchführen. Die gründliche Reinigung von Enzymtracern ist notwendig, um eine Konkurrenz zwischen Enzymtracer und ungebundenem Hapten zu vermeiden. Dies hätte sowohl eine Erniedrigung der Signalhöhe als auch eine drastische Verminderung der Test-Empfindlichkeit zur Folge.

Die Abtrennung von underivatisiertem Enzym ist schwierig und meist auch nicht notwendig. Durch einen großen Überschuß an Kopplungsreagenz kann der Anteil an underivatisiertem Enzym stark vermindert werden. Das native Enzym stört normalerweise im heterogenen Immunoassay nicht, so lange nicht derartig hohe Konzentrationen erreicht werden, daß unspezifische Adsorption ein Problem wird.

## 7.7 Reinheitskontrolle

Für die Untersuchung von Alkylamin-Triazinderivaten eignet sich besonders die Kapillar-Gaschromatographie [358]-[361]. Dies ermöglicht es, den Anteil von verunreinigenden Triazinen genau zu quantifizieren (Einschränkung: Die Verunreinigungen müssen GC-gängig sein). Für neue Derivate, bei denen keine Standardsubstanz zur Verfügung steht, eignet sich ein Quadrupol-GC-MS, da so auch unbekannte Verbindungen identifiziert werden können.

Steht kein Gaschromatograph zur Verfügung, so kann eine Reinheitskontrolle auch mittels Dünnschichtchromatographie [151][362]-[365] erfolgen. Zur Überprüfung eines Syntheseverlaufs genügt meistens Dünnschichtchromatographie auf kleinen Standard-Platten (Silicagel, 4 x 8 cm). Zur Kontrolle auf Verunreinigungen nach einer Synthese eignen sich insbesondere die neuen hochauflösenden HPTLC-Platten [366], die in einem handlichen 5 x 5 cm Format erhältlich sind. Die Detektion von Triazinen auf mit Fluoreszenzindikator versehenen DC-Platten ist denkbar einfach: Im UV-Licht löschen Triazine durchwegs die Fluoreszenz der Platte sehr stark. Sprühreagenzien oder andere Derivatisierungen sind also nicht notwendig.

Problematisch sind Triazin-Carbonsäuren, Hydroxy- und Desalkylmetaboliten: Teilweise wegen ihrer schlechten Löslichkeit in Wasser und in Lösungsmitteln und teilweise wegen ihren niedrigen Dampfdrücken, die eine Untersuchung im GC oft vereiteln. Gaschromatographische Untersuchungen werden erst nach Derivatisierung (z.B. Methylierung [367], Silylierung [368]) möglich. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, daß auch die Derivatisierung nur mit Ausbeuten < 100 % abläuft und so neue Verunreinigungen als Artefakte auftreten können. Hier ist die Dünnschichtchromatographie eindeutig überlegen: Direkt aus dem Reaktionsansatz können Proben gezogen und untersucht werden. Zu beachten ist hier aber, daß z.B. Carbonsäuren leicht Salze bilden, die in üblichen Laufmitteln nicht mobil sind. Will man Carbonsäuren chromatographieren, so verwendet man günstigerweise leicht saure Laufmittel (z.B. mit einem geringen Gehalt Ameisensäure).

Noch verbesserungsfähig ist die Methode der Tracercharakterisierung. So wurden zu dieser Arbeit die Tracer ausschließlich im ELISA getestet, abgesehen von vereinfachten Tests zur Erhaltung der Enzymaktivität. Es wäre jedoch durchaus hilfreich, Daten über Reinheit und Kopplungsdichte zu erhalten. Dieses Problem könnte eventuell mit dem Einsatz moderner Laser-Desorptions-Massenspektrometern gelöst werden. Übliche Methoden wie UV-Spektroskopie oder chemische Quantifizierung von Aminogruppen o.ä. sind m.E. nicht zuverlässig und können allenfalls eine Schätzung liefern. Es wird auch nur ein Mittelwert gemessen - man erhält keine Information über die Verteilung unterschiedlicher Spezies.

## 7.8 Strukturanalyse

Für die strukturanalytische Untersuchung von Triazinderivaten sind im allgemeinen alle üblichen Methoden durchführbar: Massenspektrometrie, IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  und andere. Schwierigkeiten gibt es, wie schon im Abschnitt "Reinigung" erwähnt, bei schwer löslichen und schwer flüchtigen Derivaten. So kann es durchaus Probleme bereiten, für NMR-Untersuchungen ausreichende Mengen in Lösung zu bringen.  $\text{D}_6\text{-DMSO}$  ist das einzige deuterierte Lösungsmittel, das zumindest annähernd ausreichende Lösungseigenschaften hat. Bei massenspektrometrischen Methoden sind FAB und ähnliche Varianten am besten geeignet.

Zur Strukturanalyse von Enzymtracern gibt es nur wenige Methoden, die bisher angewendet wurden. Für Proteine sind als Routine-Methode SDS-PAGE, native PAGE, isoelektrische

Fokussierung und Gelchromatographie zu nennen. Obwohl keine eigenen Erfahrungen mit elektrophoretischen Methoden vorliegen, dürfte sich besonders die isoelektrische Fokussierung zur Analyse von Tracern gut eignen. Die Massenunterschiede machen bei einem Kopplungsschritt typischerweise nur 0.5-1% aus. Trotzdem ist eine Trennung zu erwarten, denn bei jeder Kopplung wird aus einer Aminogruppe ein Amid und damit eine positive Ladung des Proteins vernichtet. Da Proteine bei üblichen pH-Werten nur wenige Ladungen tragen, dürfte ein Unterschied von einer Ladung einen beträchtlichen Unterschied in der Mobilität im elektrischen Feld ausmachen bzw. den isoelektrischen Punkt stark verändern [369].

Als Alternative kommt insbesondere die matrixunterstützte Laserdesorptions-Massenspektroskopie in Frage. Die Massenauflösung dürfte ausreichen, um die verschieden substituierten Spezies aufzutrennen. In Kombination mit einer enzymatischen Spaltung bzw. einem Bromcyan-Abbau dürfte es sogar möglich sein, den genauen Ort der Derivatisierung am Enzym bzw. am Protein zu lokalisieren.

## 7.9 Immunisierung

Da die Immunisierung ein ganz zentraler Punkt bei der Herstellung von Immunoassays ist, sollen hier die m.E. interessantesten Punkte kurz angesprochen werden.

Grundlegende Verfahrensvorschriften können aus den Standardtexten zum Immunoassay entnommen werden, die z.B. im Einführungsteil zitiert wurden. In diesem Zusammenhang sind auch Überlegungen zum aktuellen Thema Tierschutz angebracht [370], da in der jetzigen Form der Antikörperherstellung (polyklonal und monoklonal) zwangsläufig Tiere gebraucht werden. Erst wenn die gentechnologische Herstellung von Antikörpern in der Praxis Einzug hält, kann hier eine grundsätzliche Wende erwartet werden.

Die Auswahl der Tierart und Rasse erfolgt meist nach praktischen Erwägungen, z.B. der Menge des Antiserums, das gebraucht wird. Für polyklonale Antikörper werden meist Kaninchen bevorzugt, da sie eine für viele Zwecke ausreichende Menge Serum liefern und zudem leicht gehalten werden können. Bei größerem Antikörperbedarf ist die Verwendung von Schafen oder Ziegen möglich. Daß die Auswahl einer bestimmten Art oder Rasse erheblichen Einfluß auf die Qualität der Antikörper haben kann, ist weitgehend unbestritten [371]. Unglücklicherweise ist unbekannt, auf welchen Mechanismen diese Unterschiede beruhen. Daher kann bisher nicht gezielt die optimale Art oder Rasse ausgewählt werden. Erfolg oder Mißerfolg ist folglich in gewissem Ausmaß vom Zufall abhängig. Bei monoklonalen Antikörpern stellt sich nur die Frage der Zuchtlinie, da bisher nur von Mäusen leistungsfähige Myelomzellen zur Verfügung stehen. Obwohl sich bestimmte Mausstämme als Quasi-Standard etabliert haben, gibt es gleichermaßen keine nachvollziehbaren Regeln zur Auswahl.

Da hier nur von Haptenen die Rede ist, muß ein Carrier verwendet werden, um sie immunogen zu machen. Hier hat sich die Regel bewährt, möglichst dem Tier nicht verwandte Proteine zu verwenden. Dies erklärt den Erfolg von Hämocyanin, das aus Schnecken gewonnen wird und das Immunsystem von Säugetieren sehr stark stimuliert. Eine exotische, aber möglicherweise zukunftsreiche Variante ist die Verwendung von Dendrimeren [372], die mit antigenen Peptiden beladen wurden ("Multiple Antigen Peptide System").

Die Kopplungsdichte des Haptens am Carrier ist Thema andauernder Kontroversen. Es gibt Hinweise, daß zu hohe und zu niedrige Kopplungsdichten ungünstig sein können. Mehrfach bestätigt wurde die Theorie, daß die Menge des injizierten Immunogens kritisch ist. So erhält man in der Tendenz höher affine Antikörper bei geringeren Immunogenmengen. Dagegen kann Zusammenhang zwischen der Art bzw. dem Ort der Injektion mit der Qualität der Antikörper nicht sicher nachgewiesen werden. Das Boosten (Auffrischen) der Immunisierung muß in einer Phase niedrigen Antikörpertiters erfolgen, da sonst das Immunogen sofort neutralisiert wird.

Das sog. Adjuvans [373] ist ein unterstützendes Mittel, das die Immunogenität verstärkt und zudem eine Depotwirkung ausübt. Geradezu klassisch ist das "Komplette Freundsches Adjuvans" (cFA) und das "Inkomplette Freundsches Adjuvans" (iFA). Das cFA besteht aus abgetöteten Bakterien (*Mycobacterium tuberculosis*), Mineralöl und einem Emulgator, beim iFA fehlen die Bakterien. Oft werden auch inaktivierte *Bordetella pertussis*-Bakterien zugesetzt. Diese doch ziemlich alchemistischen Mischungen sind erstaunlicherweise sehr erfolgreich. Sie sind aber sowohl für Mensch und Tier ziemlich riskant bzw. belastend, so sind besondere Sicherheitsvorkehrungen bei der Anwendung zu beachten. Die schweren Nebenwirkungen des Freundsches Adjuvans (z.B. Entzündungen an der Injektionsstelle, Fieber und Granulombildung) sind der Grund wieso cFA und iFA beim Menschen für Impfungen verboten sind, sogar als Bestandteil von Veterinär-Vaccinen ist cFA nicht geeignet [374]. Zwar wurden Aluminiumhydroxid und methyliertes BSA schon vor längerer Zeit als Adjuvantien beschrieben. Trotzdem haben sie das cFA nicht verdrängen können.

Neuerdings sind jedoch erhebliche Fortschritte [375][376] auf diesem Gebiet gemacht worden, die die Anwendung von cFA entbehrlich erscheinen lassen. Besonders interessant sind Arbeiten [374], in denen versucht wurde, die Minimalstruktur der Bakterienzellwand zu ermitteln, die den unterstützenden Effekt bei der Immunisierung verursacht. Diese Minimalstruktur wurde als N-Acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (Muramylpeptide) identifiziert. Es konnte gezeigt werden, daß dieses Glycopeptid einen ähnlichen Effekt wie cFA hat, allerdings mit geringeren Nebenwirkungen. Zu nennen wären hier auch das GMDP (Glycopin) sowie Murabutid, die als wirksame und sichere Adjuvantien für Impfungen gelten [377]. Ein weiteres System basiert auf der Verwendung von 6,6'-Trehalosedimycolat (TMD, Cord Factor, aus *Mycobacterium bovis*). Es werden Mischungen mit Öl, Tween 80 und Monophosphoryl Lipid A bzw. einem nicht näher spezifizierten Zellwandskelett angeboten [378].

Eine andere Strategie wird bei der Anwendung von Pam<sub>3</sub>Cys (S-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-cystein) bzw. Pam<sub>3</sub>Cys-Ser verfolgt [379]-[381]. An die freie Carboxylgruppe der Aminosäure wird kovalent ein Peptid von ca. 15 Aminosäuren gekoppelt [382]. Das Konjugat ergibt ein nicht-pyrogenes, niedermolekulares Immunogen, das ohne Adjuvans eingesetzt wird. Bei diesen Substanzen ist kein Boosten (Auffrischungsimpfung) notwendig. Zudem wurden erfolgreiche *in vitro* Immunisierungen durchgeführt.

Wenn man von lipidähnlichen Substanzen spricht, so denkt man natürlich auch an Liposomen. GREGORIADIS [383] hat einen Übersichtsartikel zum Thema Liposomen als Adjuvantien veröffentlicht. Dennoch sind auf diesem Gebiet bisher erst Teilerfolge erzielt worden.

Sehr vielversprechend sind die Ergebnisse einer Arbeitsgruppe der BAYER AG [374]. Es wurde ein immunologisch sehr wirksames Derivat (BAY R 1005) gefunden, das sich aus einem Aminozucker, einer Aminosäure, einem langkettigen Alkylamin sowie einer Fettsäure zusammensetzt. Bei einem Experiment mit infektiösen Viren war die Überlebensrate von Mäusen 100 % bei Verwendung von BAY R 1005 und nur 60 % mit Komplettem Freundschens Adjuvans. Auch der Antikörpertiter bei Immunisierung mit Ovalbumin ließ sich mit dem Peptidoglycolipid BAY R 1005 stark steigern.

Zusammenfassend kann man sagen, daß es eine erhebliche Anzahl von cFA-Ersatzstoffen gibt. Das 1937 erstmals verwendete cFA gilt bis heute als Standard-Adjuvans im Forschungsbereich, obwohl die neueren Immunstimulantien vergleichbare, in einigen Fällen sogar deutlich überlegene immunologische Eigenschaften zeigen. Viele dieser Adjuvantien wurden in klinischen Studien auf ihre Wirkungen und Nebenwirkungen genau untersucht.

Es erscheint durchaus angebracht, bei der Herstellung von Antikörpern mindestens die Kriterien einer Anwendung im Veterinärbereich anzulegen und den Versuchstieren damit unnötige Belastungen zu ersparen. Man sollte nicht das Risiko eingehen, aus Bequemlichkeit die Akzeptanz der Immunoassays in der Öffentlichkeit aufs Spiel zu setzen. Die zusätzlichen Kosten dürften sich im nichtsignifikanten Bereich bewegen.



## III. ZIELE UND AUFGABENSTELLUNG

Trotz langjähriger Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Hapten-Immunoassays ist es bisher nicht gelungen, den Anteil der Empirie an der Entwicklung neuer Assays entscheidend zu vermindern. Es existieren zahllose immunologische Tests zur Bestimmung von Stoffen niedriger Molmasse. Die Resultate haben meist mehr exemplarischen als allgemein anwendbaren Charakter. Zudem ist es schwer, aus der Flut publizierter, oft aber widersprüchlicher Daten konsensfähige Schlußfolgerungen zu ziehen.

Unter dem Eindruck dieser unklaren Situation sollte nicht noch ein weiterer Immunoassay der Reihe der bisher existierenden hinzugefügt werden. Es wurde vermutet, daß insbesondere Untersuchungen der grundlegenden Mechanismen eines Immunoassays neue Erkenntnisse und Fortschritte bringen würden. Vorversuche hatten gezeigt, daß ELISAs ein wesentlich komplexeres Verhalten zeigen als durch einfache Modelle prognostiziert wurde.

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit besteht aus Untersuchungen zur Kinetik von Immunoassays und der Entwicklung von neuen Methoden zur Messung kinetischer Konstanten. Dies ist im Zusammenhang mit Bemühungen zu sehen, den Verlauf von Immunoassays mathematisch zu beschreiben und numerische Computersimulationen durchzuführen. Simulationen können nur dann realistische Ergebnisse liefern, wenn zu sämtlichen kinetischen Konstanten Meßwerte oder wenigstens gute Schätzungen vorliegen.

Die Computersimulationen sollten nicht nur zur Reproduktion von üblichen ELISA-Meßwerten herangezogen werden, sondern auch zur Überprüfung diverser Hypothesen und zur Entwicklung neuer Testkonfigurationen.

Ein zweiter Hauptpunkt der hier vorgestellten Arbeiten betrifft Struktur-Wirkungsbeziehungen. Es wurden schon viele Hypothesen veröffentlicht, die sich auf den Einfluß von Strukturvariationen von Immunogenen, Tracern und immobilisierten Haptenen beziehen. Um diese Hypothesen auf den Prüfstand zu stellen, sollten zahlreiche Triazinderivate synthetisiert und im ELISA vermessen werden. Ein Schwerpunkt sollte die Untersuchung des Spacereinflusses sein.

Die Kopplung von Haptenen an Proteine sollte so optimiert werden, daß eine reproduzierbare Herstellung von Enzymtracern und immunogenen Derivaten gelingt. Allgemeine Methoden, wie die breit anwendbare Aktivierung von Carbonsäuren, könnten dann leicht auf viele Haptene übertragen werden, die eine Carbonsäuregruppe besitzen bzw. in die eine solche eingeführt werden kann.

Ein primäres Ziel war es, die zahlreichen potentiellen Einflußmöglichkeiten auf Sensitivität und Selektivität von ELISAs insoweit zu untersuchen, um wirksame von unwirksamen Strategien unterscheiden zu können. Die Aufgabenstellung war sinnvollerweise relativ allgemein formuliert. Dies ermöglichte es, die Details der Aufgabenstellung dem kontinuierlichen Kenntniszuwachs anzupassen, experimentelle Sackgassen rechtzeitig aufzugeben und neue erfolgversprechende Wege zu suchen.

## IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

## 1 Kinetik von Enzymimmunoassays

## 1.1 Allgemeines

In dieser Arbeit wurde versucht, eine möglichst umfassende Beschreibung der kinetischen Vorgänge in einem Immunoassay zu erreichen. Hierzu war es notwendig, die Randbedingungen zu klären, praktikable Methoden zur Messung von kinetischen Konstanten zu finden und die Ergebnisse in einem Modell zu verarbeiten. Mit Hilfe simulierter Modelldaten sollten Prognosen für die günstige Optimierung von Immunoassays erstellt werden.

Auf Basis der in Abb. 8 angegebenen Reaktionsgleichungen erfolgten alle Berechnungen und Simulationen.

Es wurden bestimmte Einschränkungen vorgenommen, um das System sinnvoll zu vereinfachen: Die "Antikörperkonzentration" entspricht der Konzentration der Bindungsstellen, eine eventuell mögliche Multivalenz wurde nicht speziell berücksichtigt. Trotz der heterogenen Charakteristik des Tests wurde angenommen, daß die Reagenzien homogen im betreffenden Volumen verteilt sind. Im Sinne einer reinen Formalkinetik sind die Konstanten, die hier gewonnen wurden, als "scheinbare" Konstanten anzusehen. Korrekturen wurden nicht vorgenommen. Bei Tracerkonzentrationen wurde eine vielleicht vorhandene Verunreinigung mit ungekoppeltem Enzym nicht berücksichtigt. Die Bindungsstellen wurden als homogen angesehen, die Dauer von Durchmischungsvorgängen wurde vernachlässigt.

## 1.2 Reaktionsordnungen

Die Überprüfung, ob die Antikörper-Tracer-Reaktion den angenommenen Geschwindigkeitsgesetzen gehorchen, wurde die Reaktionsordnung bezüglich Antikörper und Tracer untersucht. Die Methode der Anfangsgeschwindigkeiten [384][385] ist mit Mikrotiterplatten gut realisierbar. Der Tracer wird in festen Zeitinkrementen zugegeben und am Ende wird die gesamte Platte gewaschen. Der Waschschrift entspricht dem Ende der Reaktion.

Ein Geschwindigkeitsgesetz der Form

$$\frac{d[A]}{dt} = v_A = k [A]^a [B]^b \quad (\text{Gl. 30})$$

kann durch den Übergang zum Anfangszustand zum Zeitpunkt  $t=0$  und durch Logarithmieren in die Gleichung

$$\log v_{A,0} = \log k + a \log [A]_0 + b \log [B]_0 \quad (\text{Gl. 31})$$

überführt werden. Wird die Konzentration B konstant gehalten, so ergibt sich bei einer Auftragung Logarithmus Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gegen Logarithmus  $[A]_{B=\text{const.}}$  eine Gerade. Die Steigung entspricht der Ordnung der Reaktion. Nun sind bei der hier angewandten Methode nur relative Änderungen der Reaktionsgeschwindigkeit erhältlich, nicht jedoch die Anfangsgeschwindigkeiten selbst (zumindest nicht in einer in SI-Einheiten umrechenbaren Form). So ist zwar die Form auswertbar, nicht aber die Steigung. In Abb. 23 ist ein solcher Plot zu sehen. Es zeigt sich, daß in guter Näherung von einer Geraden gesprochen werden kann. Da sich auch in einer linearen Auftragung eine Gerade ergibt, kann mit Berechtigung von einem Verhalten pseudo-erster Ordnung ausgegangen werden. Auch die Vermessung eines anderen Tracers führte zu einem vergleichbaren Ergebnis (Daten nicht dargestellt).

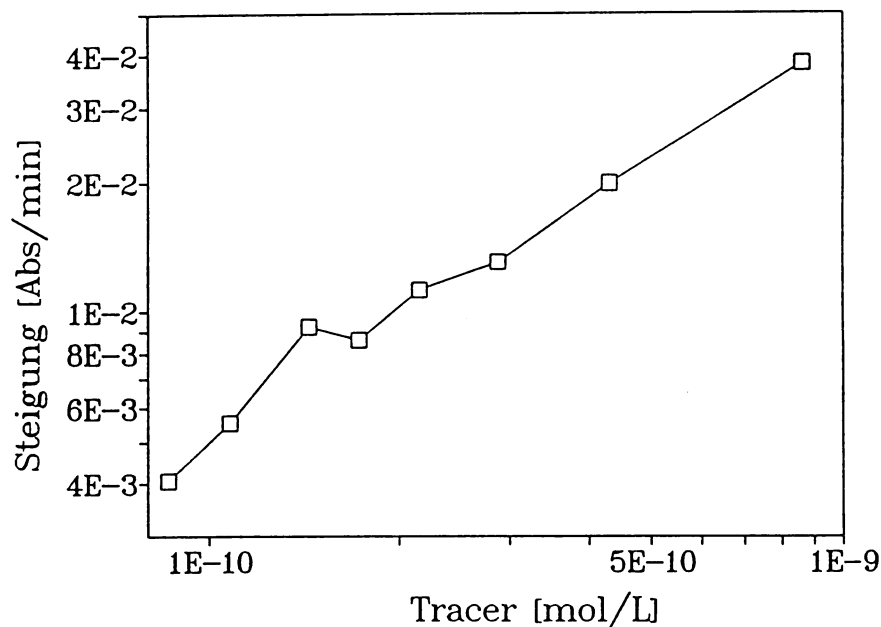


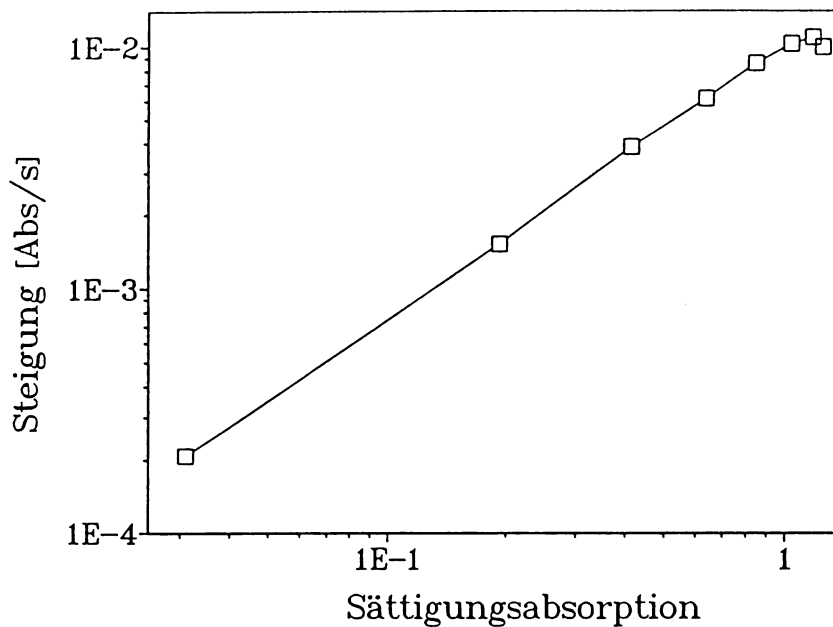
Abb. 23: Reaktionsordnung bezüglich Enzymtracer. Antikörper: Ciba 21-1 1:10.000, 200  $\mu\text{L}$ , ca. 18 h, Vorinkubation: 200  $\mu\text{L}$  PBS, Inkubation 100  $\mu\text{L}$  Tracer (i-Pr/Cl/C6), Konzentration variabel.

Auch die umgekehrte Messung, Tracerkonzentration konstant und Antikörperkonzentration variiert, zeigt die erwarteten Ergebnisse. Da die Antikörper immobilisiert und die Antikörperkonzentration weitgehend unbekannt ist, tritt eine besondere Komplikation auf: Man kennt nicht die Menge des immobilisierten Antikörpers. Es wurden daher zwei Methoden parallel versucht:

- a) Der Antikörper wurde in bestimmten Stufen verdünnt. Die Konzentration des immobilisierten Antikörpers wurde proportional der eingesetzten Coating-Konzentration gesetzt.
- b) Der gecoatete Antikörper wurde mit einer hohen Konzentration Tracer versetzt. Es wurde angenommen, daß die gebundene Tracermenge proportional zur Menge des immobilisierten Antikörpers ist.

Beide Methoden erbrachten weitgehend identische Ergebnisse. Dies könnte man so interpretieren, daß beim Coaten der Antikörper im angegebenen Konzentrationsbereich quantitativ auf der Platte gebunden wird (zumindest mit einer konzentrationsunabhängigen Effizienz). Die Sättigungsabsorption ist als relatives Maß zur Quantifizierung der immobilisierten Antikörpermenge definiert worden. Die Sättigungsabsorption wird durch Absättigen der Antikörper mit Enzymtracer und nachfolgendem Entwickeln mittels chromogenem Substrat erhalten. Genauer gesagt wird die Menge der sterisch zugänglichen Bindungsstellen gemessen.

Die Form der zur Bestimmung der Reaktionsordnung hergestellten Kurven ist sehr interessant. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit steigt linear mit der Antikörper-Konzentration, sowohl im doppelt logarithmischen Plot (Abb. 24), als auch im linearen. Auch hier läßt sich mit guter Genauigkeit eine Reaktion pseudo-erster Ordnung feststellen. Es gibt jedoch bei hohen Antikörperkonzentrationen eine Abweichung vom linearen Verhalten. Dies wurde bei fast allen bisher untersuchten Antikörpern gefunden (Daten nicht dargestellt). Die Steigung sinkt auf Null ab, sie wird sogar etwas negativ. Dies könnte die Grenze zur Diffusionslimitierung darstellen. Bei sehr hohen Antikörpermengen sollte eine waagrechte Linie resultieren, da der Stoffmengenfluß nur noch von der Diffusion durch die konzentrationspolarisierte Grenzschicht bestimmt wird, nicht jedoch von der Menge des immobilisierten Antikörpers.



**Abb. 24: Reaktionsordnung bezüglich Antikörper.** Antikörper K1F4, 200  $\mu\text{L}$ , ca. 18 h, Konzentration variabel (1:10.000-1:500.000), 50  $\mu\text{L}$  PBS vorinkubiert, 200  $\mu\text{L}$  Tracer 1:100.000 (i-Pr/Et/3MPS), 100 s, Entwicklung 30 min, Sättigung: Tracer 1:10.000, 6 h, 300  $\mu\text{L}$  (PSB + 0.1 % BSA), Substrat 1:4 verdünnt, 2 min.

Ein ähnliches Phänomen wurde kürzlich auch in einer Publikation [35] beschrieben. In der angesprochenen Arbeit wird ein Überladen der Platte mit Antikörpern verantwortlich gemacht. Die "überstehenden" Antikörper würden später zusammen mit dem Tracer abgewaschen. Nach den Ergebnissen in Abb. 53 erscheint dies jedoch weniger wahrscheinlich. Da die Steigung auch negativ wird, kann das Auftreten dieser Abweichung von der Linearität auch mit sterischen Problemen zusammenhängen. Es ist davon auszugehen, daß bei hohen Antikörperdichten sterische Restriktionen auftreten, die das Binden eines großen Moleküls (Tracer) stark behindern. In einer dichten Packung von Antikörpern sind entsprechend weniger Bindungsstellen zugänglich. Daher erscheint es kontraproduktiv, die Antikörperdichte stark zu erhöhen, um die Menge des gebundenen Tracers (und damit die Signalhöhe) zu vergrößern. Es muß betont werden, daß dieses Phänomen bei vielen Antikörpern in reproduzierbarer Weise auftritt und kaum von der Art des Antikörpers abhängt. Auch dies spricht für ein rein "räumliches" Problem.

Es ist daher nicht auszuschließen, daß die gefundene Abweichung nichts mit Diffusion zu tun hat und nur mit einer Überschreitung einer kritischen Packungsdichte zusammenhängt. Auf jeden Fall kann gefolgert werden, daß Diffusion bei niedrigen Antikörper-Dichten, wie sie normalerweise im ELISA eingesetzt werden, keine Rolle spielt.

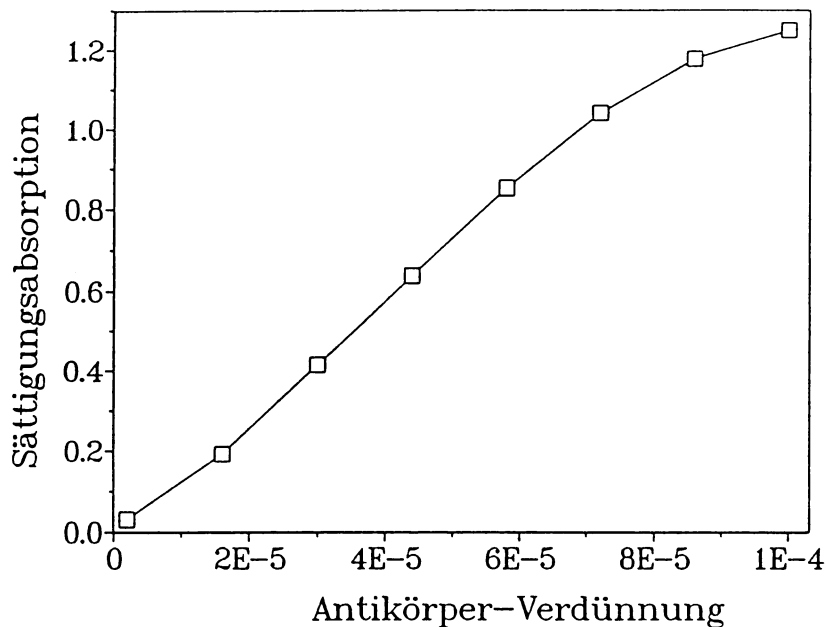


Abb. 25: Vergleich Antikörper-Verdünnung und Sättigungsabsorption. (Bedingungen siehe Abb. 24)

In Abb. 25 ist die Antikörperverdünnung gegen die "Sättigungsabsorption" aufgetragen. Man erkennt in der Grafik, daß bei niedrigen Antikörperkonzentrationen die beiden Parameter proportional sind, erst bei hohen Konzentrationen treten stärkere Abweichungen auf. Diese Ergebnisse stehen in gutem Einklang mit den Resultaten von CANTARERO et al. [386], der  $^{125}\text{I}$ -markierte Proteine untersucht hat und eine Linearität der Adsorption bis ca. 150 ng/cm<sup>2</sup> gefunden hat. Trotz einer erhöhten Antikörpermenge steigt die Sättigungsabsorption kaum mehr an. Dies untermauert die Annahme, daß hier sterische Probleme maßgebend sind. Man könnte auch eine niedrigere Effizienz der Coatingprozedur bei hohen Konzentrationen vermuten (geringerer gebundener Anteil). Dies widerspricht jedoch dem Ergebnis in Abb. 24. In diesem Fall sollte sich durch die Verwendung des Parameters Sättigungsabsorption die Nichtlinearität vollständig beseitigen lassen. Zur endgültigen Klärung, auf welchen Mechanismus die Abweichung bei hohen Konzentrationen zurückzuführen ist, müssen weitere Experimente durchgeführt werden.

### 1.3 Dissoziationskonstanten des Tracers

Ausgangspunkt war die Idee, kinetische Konstanten zu messen, um einen ELISA quantitativ beschreiben zu können. Am einfachsten wurde die Messung der Dissoziationskonstante des Tracers eingeschätzt, da hier das Label direkt verfolgt werden kann und keine Vorkenntnisse über die Konzentrationen erforderlich sind. Man erwartete näherungsweise exponentielle Verläufe, die eine Berechnung der Dissoziationskonstante leicht ermöglichen.

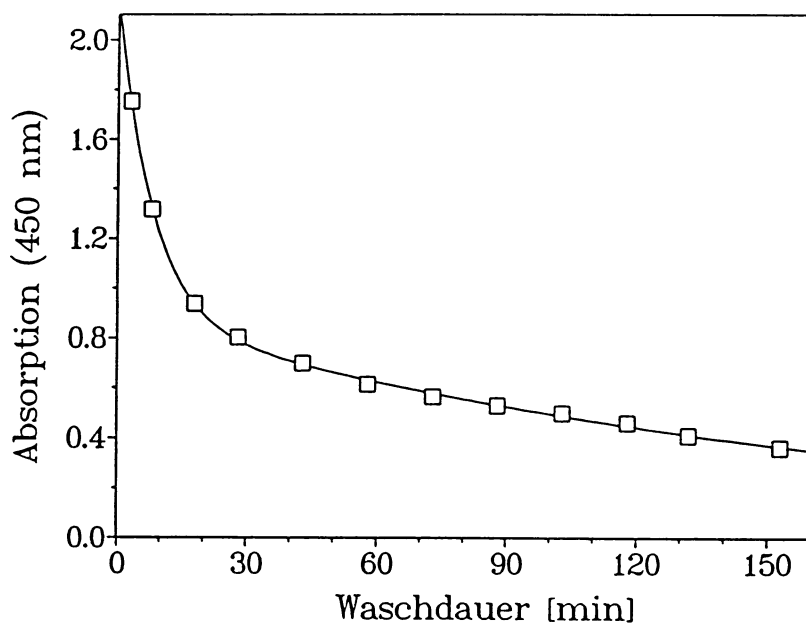
In Abb. 26 ist das Ergebnis einer der ersten Messungen dargestellt. Es ist auch ohne quantitative Auswertung schnell ersichtlich, daß hier kein einfaches exponentielles Gesetz vorliegen kann. Mindestens zwei Phasen der Dissoziation lassen sich gut unterscheiden. Versucht man

ein Fitting mit einer doppelten Exponentialfunktion, so erhält man sehr gute Anpassungen. Zusätzliche Erweiterungen der Gleichung führen zu keinen signifikanten Verbesserungen. Man erhält zwei Dissoziationskonstanten, die sich ungefähr um den Faktor 20 unterscheiden. Die erste Hypothese zu diesem Experiment bezog sich auf die Valenz des Tracers. Aus den gut differenzierten Dissoziationskonstanten wurde geschlossen, daß es sich um zwei unterschiedlich gebundene Spezies handeln müsse. Dies könnte man sich primär durch die potentielle Mehrbindigkeit von Tracer und Antikörper erklären. So würden je nach sterischem Angebot die Tracer-Moleküle einfach oder doppelt gebunden. Dies müßte sich in einem analogen Dissoziationsverhalten zeigen. Zudem wurde in einer Arbeit über indirekte Immunoassays ein valenzabhängiges Verhalten gefunden [387]. Weitere ähnliche Experimente brachten anfangs keine neuen Erkenntnisse.

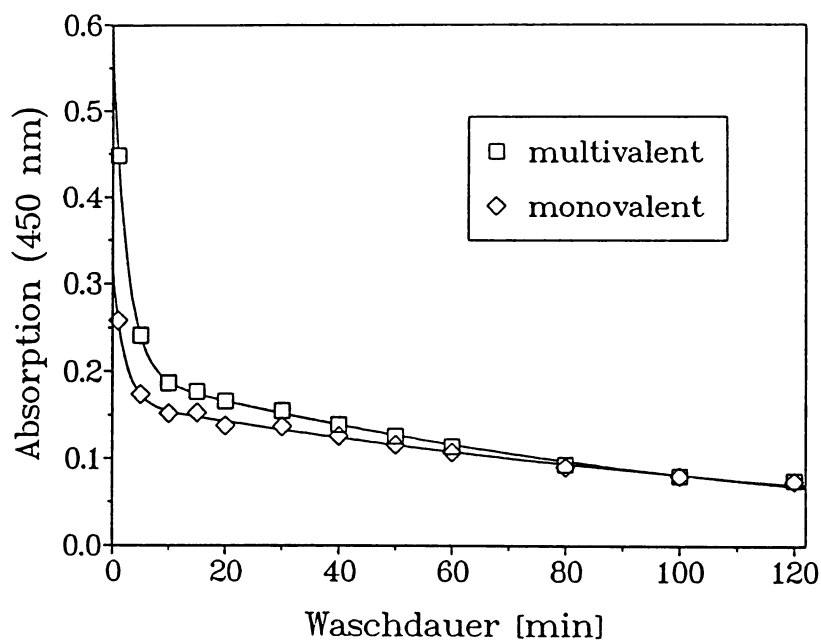
Die Entscheidung über die Richtigkeit der o.g. Hypothese fiel mit einer neuen Tracersynthese. Durch eine spezielle Haptenverdünnungsmethode konnte ein Peroxidase-Tracer mit vorwiegend mono-Derivatisierung hergestellt werden ("Mono-Tracer"). Hierzu wurde die Triazincarbonsäure (Hapten) 1:10 mit 2,4-Dinitrophenylelessigsäure vermischt und aktiviert. Da ein Meerrettichperoxidase-Molekül nur 1-3 derivatisierbare Aminogruppen besitzt, ist die Chance gering, daß mehrere Triazin-Haptene an einem Peroxidase-Molekül gebunden werden. Der Vergleich mit dem normal hergestellten Tracer wird in Abb. 27 gezeigt. Das Ergebnis ist recht ernüchternd. Die Tracer verhalten sich im Rahmen des Meßfehlers identisch. Auch sollte ein monovalenter Tracer nach wenigen Halbwertszeiten die Abszisse erreichen. Dies ist nicht einmal im Ansatz zu erkennen. Eichkurven von mono- und multivalenten Peroxidase-Tracern sehen völlig identisch aus (Daten nicht dargestellt). Man muß daraus den Schluß ziehen, daß die Valenz des Tracers nicht für das merkwürdige Dissoziationsverhalten verantwortlich ist.

Zur weiteren Versuchsplanung war eine neue Arbeitshypothese notwendig. Es wird immer noch davon ausgegangen, daß es unterschiedliche Komplex-Spezies an der Mikrotiterplatte geben muß. Ist die (immunologische) Valenz nicht Ursache für die Form der Dissoziationskurve, so gibt es noch zwei weitere Möglichkeiten. Die Antikörper könnten partiell lose sein und würden bei den Waschvorgängen incl. Tracer abgelöst. In eine ähnliche Richtung würde die langsame Hemmung der Peroxidase durch den Waschpuffer weisen. Beides hätte nichts mit der Antikörper/Antigen-Reaktion zu tun und wäre ein reines Artefakt. In Abb. 53 wurde erstere Hypothese durch vielfaches Waschen überprüft und verworfen. Enzymhemmung kann nicht sicher ausgeschlossen werden. Es würde jedoch bei Ausschaltung einer eventuellen Inhibition eine noch kleinere Dissoziationskonstante resultieren, was das Problem der merkwürdigen Dissoziationskurven nicht lösen, sondern verschärfen würde.



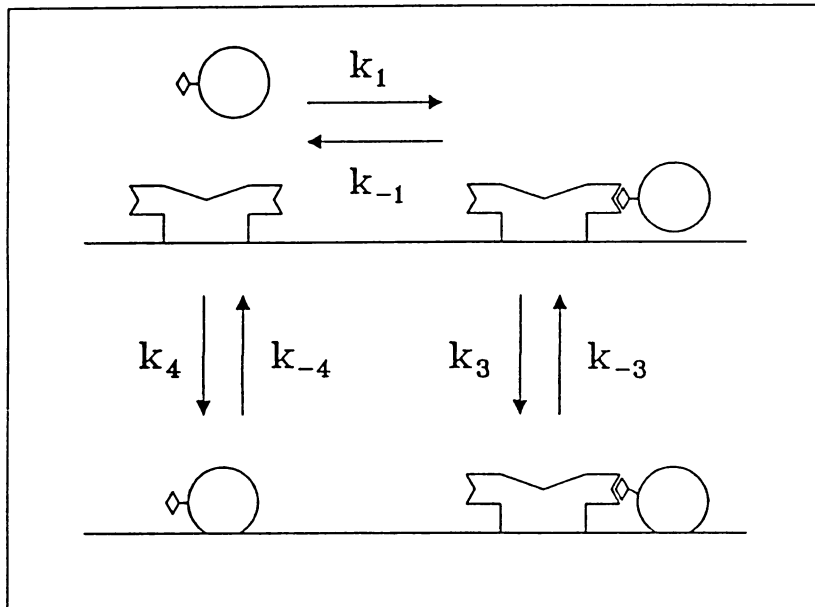


**Abb. 26:** Dissoziationskurve des K1F4-(t-Bu/Et/C6)-Komplexes. Antikörper: K1F4 1:10.000, 200  $\mu$ L, RT, ca. 18 h, Tracer: t-Bu/Et/C6 1:10.000, 4 h, RT, Entwicklung 8 min.  
 $Y=A \cdot \text{EXP}(-k_1 \cdot X)+B \cdot \text{EXP}(-k_2 \cdot X)$ ,  $A=1.28$ ,  $B=0.877$ ,  $k_1=0.12$  [1/min],  $k_2=0.0057$  [1/min],  $r=0.9997$ ,  
Hinweis:  $k_1$  und  $k_2$  sind Fittingparameter und sind nicht identisch mit den oben definierten Geschwindigkeitskonstanten.



**Abb. 27:** Vergleich eines monovalenten mit einem multivalenten Tracer. Antikörper: anti-Maus-IgG (Sigma) 1:5000, 24 h, RT, mit demin.  $H_2O$  gewaschen, getrocknet. K1F4 (20fach) 1:1000 PBS, 1 h, Tracer: t-Bu/Et/C6 1:10.000 (PBS, 10 g/L BSA, 0.1% Tween 20), 24 h, 4  $^{\circ}$ C, t-Bu/Et/C6 (mono) analog, Waschdauer variabel, Entwicklung 15 min.

Als neue Hypothese könnte man annehmen, daß die "zweite" Wechselwirkung nicht immunologischer Art ist, sondern mit einer "unspezifischen" Wechselwirkung mit der Plattenoberfläche zu tun hat. In Abb. 28 wird diese Hypothese in einer "Reaktionsgleichung" zusammengefaßt. Zudem werden zusätzliche Geschwindigkeitskonstanten definiert.



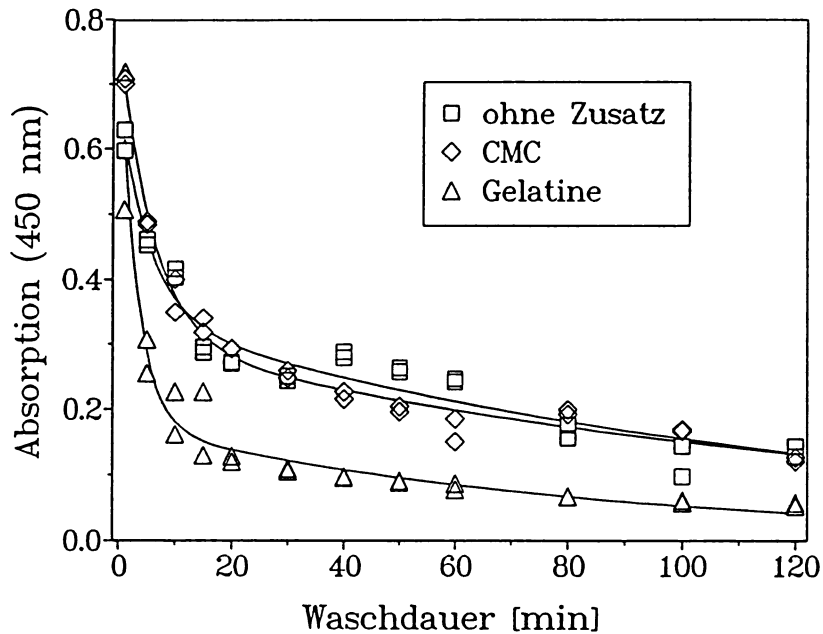
**Abb. 28: Arbeitshypothese zum Mechanismus der Tracerbindung.**  $k_1$  Assoziationskonstante (Immunkomplex/Wand),  $k_{-1}$  Dissoziationskonstante (Immunkomplex/Wand),  $k_4$  Assoziationskonstante (Tracer/Wand),  $k_{-4}$  Dissoziationskonstante (Tracer/Wand).

Nach der Bindung des Tracers an der Antikörperbindungsstelle ( $k_1$ ) könnte sich eine Folge­reaktion einstellen, die zur festen Adsorption des Enzyms an der Oberfläche führt ( $k_3$ ). Dieser adsorptive Schritt wirft sofort die Frage auf, ob Enzymtracer nicht auch ohne Hilfe des Antikörpers unspezifisch an der Plattenoberfläche adsorbieren kann ( $k_4$ ).

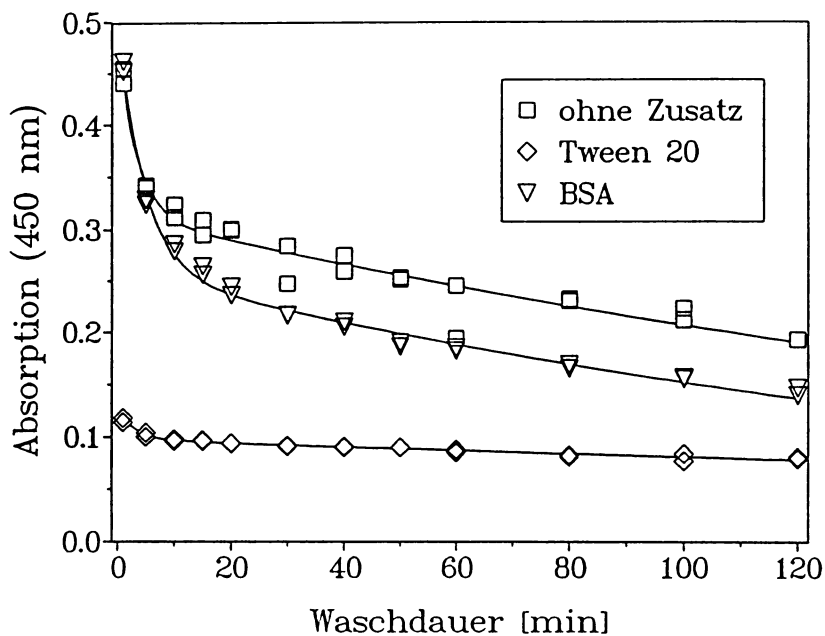
In der ersten Testserie zu diesem Ansatz wurde geprüft, ob man diese Adsorption unterbinden kann, um den ersten Teil der Reaktion ungestört beobachten zu können. Hierzu wurden Dissoziationskurven mit Zusatz von Carboxymethylcellulose (CMC) und Gelatine (Abb. 29), sowie BSA und Tween 20 (Abb. 30) durchgeführt.

Der anionische Polyelektrolyt Carboxymethylcellulose hat augenscheinlich keinen Einfluß auf die Dissoziation des Tracerkomplexes. Dagegen führt das bewährte Blocking-Reagenz Gelatine zu einer signifikanten Erniedrigung des fest gebundenen Anteils. Dies könnte, basierend auf der fibrillären Struktur der Gelatine, sowohl auf einem effektiven Blocking, als auch auf einer Protein-Protein-Wechselwirkung beruhen. Vergleicht man mit dem Blocking-Reagenz BSA, so fällt dessen geringere Effektivität auf. Dagegen wirkt Tween 20 ungewöhnlich. Es scheint die schwächer gebundenen noch leichter ablösbar gemacht zu haben. Die stark gebundene Fraktion wird zwar vermindert, aber nicht in die Nähe von Null ge-

bracht. Im Gegenteil, die noch gebundenen Tracermoleküle erscheinen besonders fest gebunden. Dies könnte auf die Existenz einer Verteilung unterschiedlichster Bindungsstärken hinweisen.



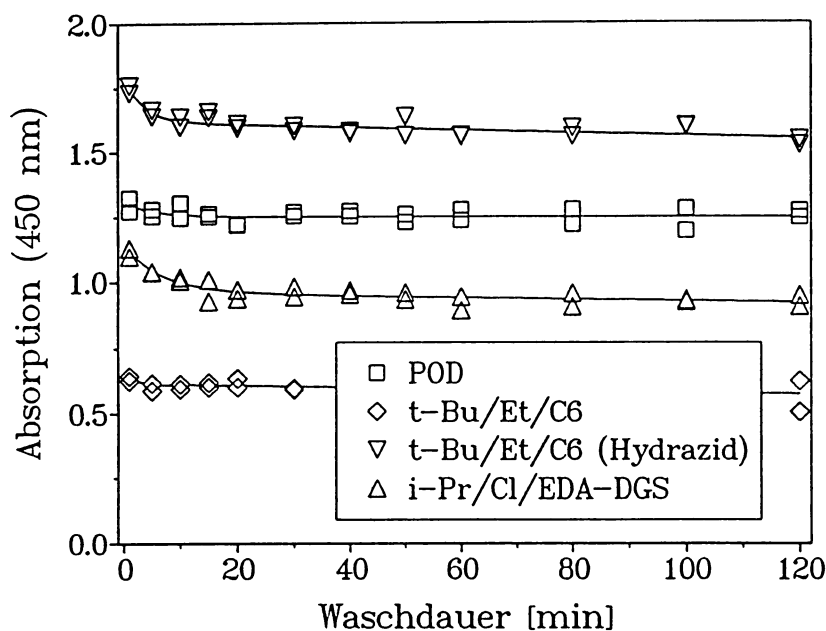
**Abb. 29:** Dissoziationskurven mit Zusatz von CMC oder Gelatine. Antikörper: K1F4 1:20.000, 4 h, 4 °C, Tracer: *t*-Bu/Et/C6 1:100.000, PBS mit je 1% Zusatz CMC (ultra low viscosity), Gelatine, 20 h, 4 °C, Entwicklung 7 min.



**Abb. 30:** Dissoziationskurven mit Zusatz von Tween 20 oder BSA. Antikörper: K1F4 1:20.000, 72 h, 4 °C, Tracer: *t*-Bu/Et/C6 1:100.000, PBS mit Zusatz von Tween 20 (0.5 %), BSA (5 %), 24 h, RT, Entwicklung 6 min.

Anschließend wurde untersucht, ob sich spezifische und unspezifische Bindung an Mikrotiterplatten charakteristisch an der Dissoziationskinetik ablesen lassen. Hierzu wurde eine ungecoatete Platte mit unterschiedlichen Peroxidase-Tracern inkubiert und dann einem Dissoziationsprozeß unterworfen. Die Ergebnisse sind in Abb. 31 dargestellt. Es ist gut erkennbar, daß die unspezifische Adsorption an Mikrotiterplatten primär sehr stark gebundene Spezies liefert. Jedoch ist bei allen Tracern mehr oder weniger stark eine stärkere Dissoziation am Anfang zu bemerken. Dies bedeutet, daß sowohl die erste, als auch die zweite (langsamere) Phase bei 100% unspezifischen Prozessen auftreten und nicht an die Anwesenheit von Antikörpern gebunden sind. Die Arbeitshypothese, daß einer der beiden Phasen direkt der Antikörper-Reaktion zugeordnet werden kann, muß stark in Frage gestellt werden.

Diese Ergebnisse sind nicht leicht mit der Tatsache in Einklang zu bringen, daß ELISAs ja unbestritten sehr gut funktionieren können und bei einem Überschuß an Antigen nur eine marginale "unspezifische" Bindung des Tracers auftritt. Es sollte beachtet werden, daß die Messung der unspezifischen Bindung mit einer ungeblockten Platte und mit Tracerkonzentrationen durchgeführt wurde, die ca. 100fach überhöht waren.



**Abb. 31: Tracer-Vergleich der unspezifischen Bindung.** Antikörper: entfällt, Inkubation: Peroxidase 1:5000, t-Bu/Et/C6-Tracer 1:1000, t-Bu/Et/C6-Tracer (Glutarsäuredihydrazid-modifiziert) 1:1000, i-Pr/Cl/EDA-DGS-Tracer 1:5000, 200 µL in PBS, 4 h, RT, Entwicklung 1 min, 2.5 min, 1.5 min, 2 min.

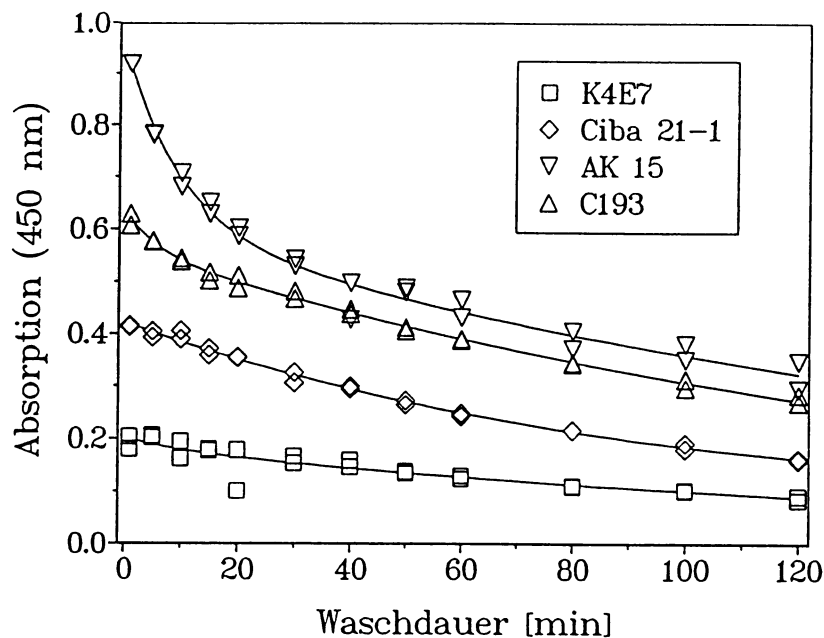
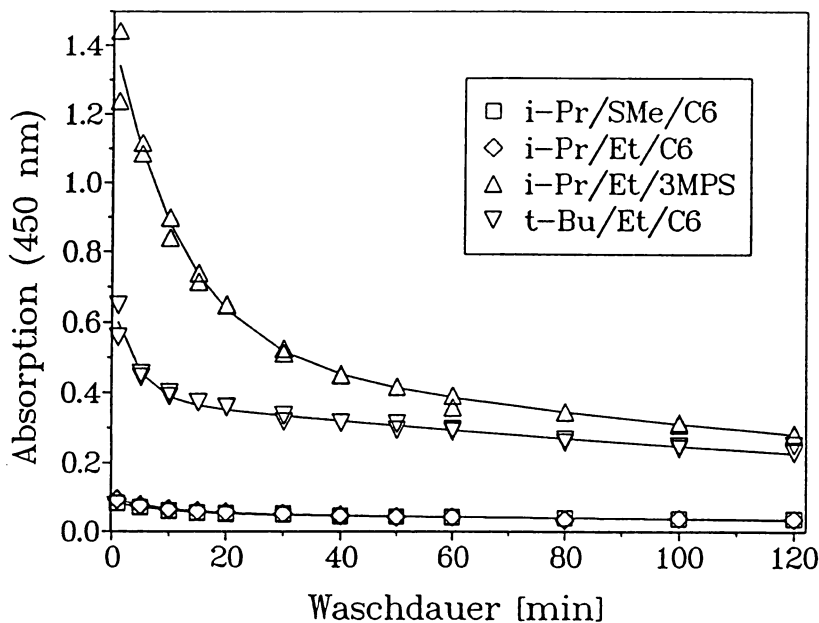


Abb. 32: Vergleich verschiedener Antikörper. Antikörper: K4E7, Ciba 21-1, AK 15, C193 1:10.000, 200  $\mu$ L, 28 h, RT, Tracer: *i*-Pr/Cl/C6 1:100.000, 200  $\mu$ L, 15 h, 4 °C, Entwicklung: 60 min, 60 s, 20 s, 5 min.

Es stellte sich nun die Frage, inwiefern Antikörper und Tracer in ihrer Eigenschaft als Bindungsprotein bzw. Ligand den Verlauf der Dissoziation beeinflussen. Es wurde eine parallele Messung mit vier Antikörpern und einem Tracer durchgeführt. Abb. 32 zeigt den Verlauf der Kurven. Grob könnte man sagen, daß Antikörper, die viel Tracer binden, auch anfangs eine schnelle Dissoziation zeigen. Der monoklonale Antikörper Ciba 21-1 fällt hier etwas aus der Reihe, weil er eine sehr gestreckte Kurve zeigt. Dies ist aber leicht erklärbar, wenn man weiß, daß dieser Antikörper der einzige unter den untersuchten war, der in hochgereinigter (chromatographierter) Form vorlag. Die anderen Antikörper waren zwar konzentriert, lagen aber in einer verhältnismäßig hohen Konzentration von Fremdprotein vor. Geht man nun davon aus, daß die Fremdproteine gleichfalls auf der Platte adsorbiert werden, so könnte man schließen, daß im Falle des Antikörpers Ciba 21-1 mehr gute Adsorptionsstellen unbesetzt geblieben sind. Es läßt sich interessanterweise zwischen dem hochempfindlichen C193 und dem unempfindlichen AK 15 kein entscheidender Unterschied ausmachen. Insbesondere die Steigungen im flachen Teil scheinen ähnlich.

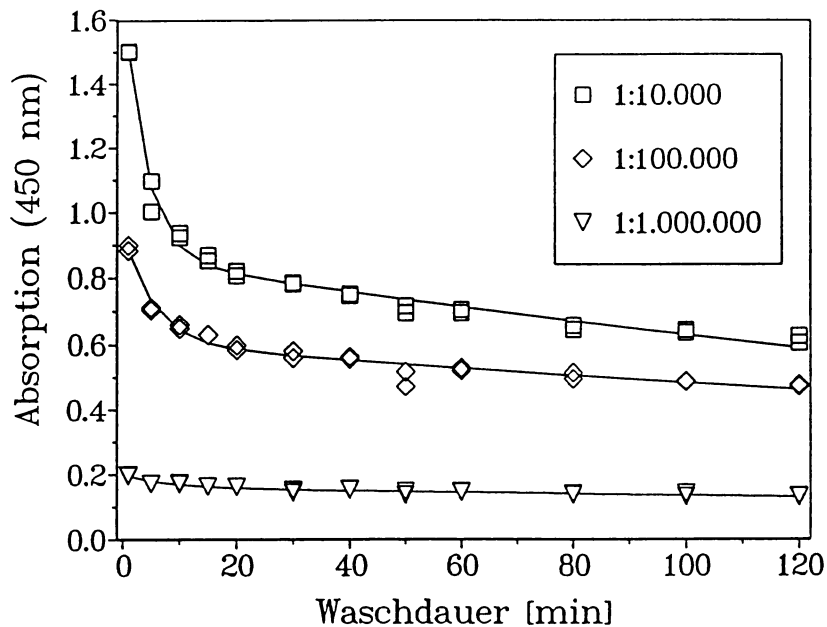
Dies stützt die Hypothese, daß der Dissoziationsprozeß weitgehend von unspezifischen Bindungen gesteuert wird. Die beobachteten zwei Phasen lassen sich zwanglos erklären. In Untersuchungen über die Bindung von Antikörpern an Polystyrolplatten [388] wurde gefunden, daß es zwei sehr unterschiedlich stark fixierte Fraktionen gibt. Die stark gebundene Fraktion korreliert weitgehend mit einer monomolekularen Schicht, die schwach gebundene wird Protein-Protein-Wechselwirkungen zugeordnet.



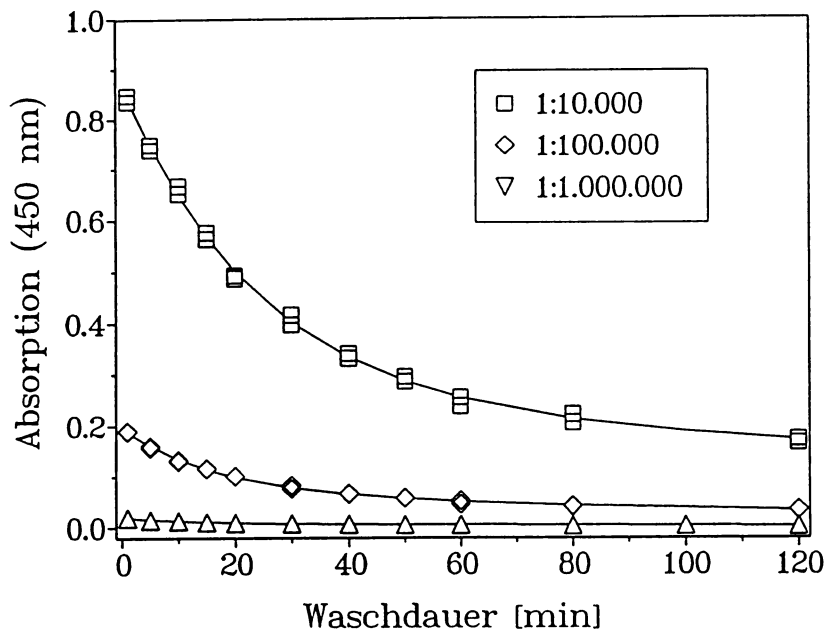
**Abb. 33: Vergleich verschiedener Tracer.** Antikörper: K1F4 1:20.000, 200  $\mu$ L, 4 h, RT, Tracer: *i-Pr/SMe/C6*, *i-Pr/Et/C6*, *i-Pr/Et/3MPS*, *t-Bu/Et/C6* 1:100.000, 200  $\mu$ L, 20 h, RT, Entwicklung: 30 min, 30 min, 9 min, 9 min.

Im komplementären Experiment wird die Tracerstruktur variiert. Besonders interessant erscheinen die stark bindenden Tracer *t-Bu/Et/C6* und *i-Pr/Et/3MPS*. Die Stärke der Tracerbindung scheint sehr viel zur Signalhöhe beizutragen: Der *i-Pr/Et/3MPS*-Tracer wird so stark durch den Antikörper K1F4 gebunden, daß eine ungewöhnlich langsame Dissoziation in der ersten Phase auftritt. Bei eher lose adsorbierten Tracermolekülen könnte die immunologische Bindung dominant werden. In der zweiten Phase verhalten sich wieder alle Tracer weitgehend ähnlich, der adsorptive Anteil gewinnt die Oberhand. Dies läßt sich noch besser bei einer Verdünnungsreihe dieser beiden Tracer erkennen. In Abb. 34 wurde der Tracer *t-Bu/Et/C6*, in Abb. 35 *i-Pr/Et/3MPS* verwendet.

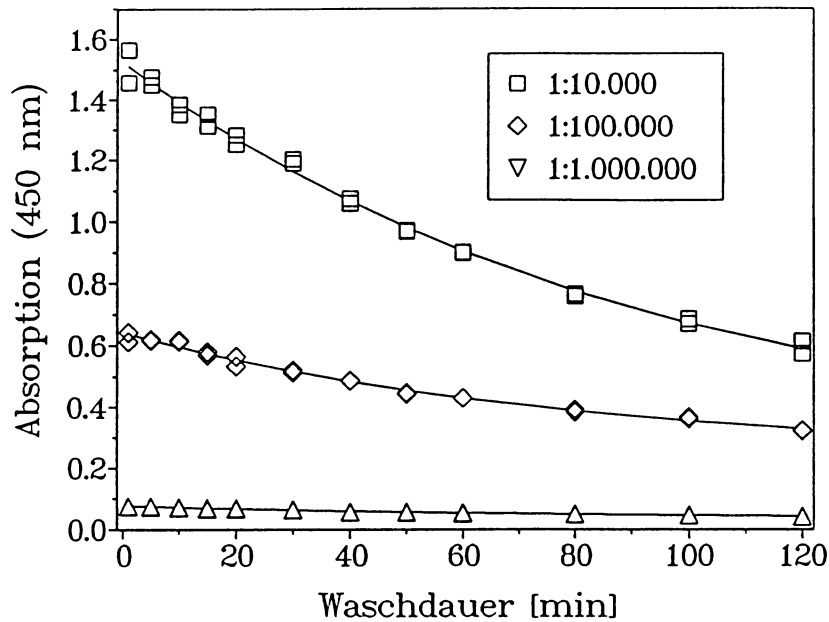
Auffällig ist die kurze "Halbwertszeit" zu Beginn der Dissoziationsprozedur mit einer anschließenden sehr gleichartigen flachen Zone. Vergleicht man direkt mit Abb. 35, so erkennt man die wesentlich langsamere Dissoziation am Anfang der Kurve. Es zeigt sich also eindeutig eine Abhängigkeit der ersten Dissoziationsphase von der Stärke der Antikörper-Tracer-Wechselwirkung. Weitere Untersuchungen wert ist die Beobachtung, daß  $k_1$  beim ersten Tracer mit der Verdünnung fällt, beim zweiten Tracer aber steigt. Sollte sich dieses Verhalten bestätigen, so gibt dies wertvolle mechanistische Hinweise. Es wäre denkbar, daß der erstere Fall von der Desorption, der letztere von der Komplex-Dissoziation dominiert wird.



**Abb. 34:** Verdünnungsreihe *t*-Bu/Et/C6-Tracer. Antikörper: K1F4 1:20.000, 200  $\mu$ L, 6 d, 4  $^{\circ}$ C, Tracer: *t*-Bu/Et/C6, 200  $\mu$ L, 20 h, RT, Entwicklung: 11 min, 11 min, 20 min. Absorptionen auf 10 min normiert,  $Y=A \cdot \text{EXP}(-k_1 \cdot X)+B \cdot \text{EXP}(-k_2 \cdot X)$ :  $k_1=0.25$  [1/min],  $k_1=0.18$  [1/min],  $k_1=0.11$  [1/min],  $k_2=0.0031$  [1/min],  $k_2=0.0022$  [1/min],  $k_2=0.0014$  [1/min],  $r=0.995$ ,  $r=0.985$ ,  $r=0.968$ . Hinweis:  $k_1$  und  $k_2$  sind Fittingparameter und sind nicht identisch mit den oben definierten Geschwindigkeitskonstanten.



**Abb. 35:** Verdünnungsreihe *i*-Pr/Et/3MPS-Tracer. Antikörper: K1F4 1:20.000, 200  $\mu$ L, 4 d, 4  $^{\circ}$ C, Tracer: *i*-Pr/Et/3MPS, 200  $\mu$ L, 20 h, RT, Entwicklung: 1 min, 3 min, 15 min. Absorptionen auf 1 min normiert,  $Y=A \cdot \text{EXP}(-k_1 \cdot X)+B \cdot \text{EXP}(-k_2 \cdot X)$ :  $k_1=0.041$  [1/min],  $k_1=0.058$  [1/min],  $k_1=0.088$  [1/min],  $k_2=0.0029$  [1/min],  $k_2=0.0056$  [1/min],  $k_2=0.0086$  [1/min],  $r=0.995$ ,  $r=0.985$ ,  $r=0.968$ . Hinweis:  $k_1$  und  $k_2$  sind Fittingparameter und sind nicht identisch mit den oben definierten Geschwindigkeitskonstanten.



**Abb. 36:** Verdünnungsreihe *i-Pr/Cl/C6*-Tracer. Antikörper: Ciba 21-1 1:20.000, 200  $\mu\text{L}$ , 2 d, 4  $^{\circ}\text{C}$ , Tracer: *i-Pr/Cl/C6*, 200  $\mu\text{L}$ , 20 h, RT, Entwicklung: 3 min, 3 min, 30 min. Absorptionen auf 3 min normiert.  $Y=A \cdot \text{EXP}(-k_1 \cdot X)$ :  $k_1=0.0080$  [1/min],  $k_1=0.0057$  [1/min],  $k_1=0.0050$  [1/min],  $r=0.996$ ,  $r=0.990$ ,  $r=0.986$ . Hinweis:  $k_1$  ist ein Fittingparameter und nicht identisch mit der oben definierten Geschwindigkeitskonstanten.

Das gleiche Experiment mit der Kombination Ciba 21-1 und *i-Pr/Cl-C6*-Tracer durchgeführt ergibt noch flachere Kurven (Abb. 36). Hier sind zwei Phasen nicht mehr nachweisbar, es wurde daher auch nur eine Dissoziationskonstante gefittet. Hier könnte sich der adsorptive Anteil durch die hohe Antikörper-Reinheit verstärkt bemerkbar machen. Möglicherweise handelt es sich um die zweite Phase der Dissoziation, die erste wäre zu klein, um mit dieser Konfiguration gemessen zu werden.

Eine interessante Interpretation des zweiphasigen Verhaltens vieler Dissoziationsprozesse könnte man von den Untersuchungen von WERTHÉN und NYGREN [389] ableiten. Sie fanden auf Antigen-beschichteten hydrophoben Quarzoberflächen eine heterogene Verteilung der Antikörper abhängig von der Affinität. Die Neigung zur Clusterbildung war umgekehrt proportional zur Affinität. Möglicherweise sind Tracermoleküle auf der Polystyroloberfläche gleichfalls in gewissem Umfang mobil und suchen sich die Bindungsstellen mit der höchsten Bindungsenergie. Im Gegensatz zu repulsiven Wechselwirkungen, die man bei hohen Tracerdichten vermuten könnte, kann man auch signifikante Protein-Protein-Bindungsenergien annehmen. Je nach Antikörper-Dichte, Tracer-Konzentration und Affinitätskonstante würden sich dann spontan Cluster bilden, die nur sehr geringe Dissoziationsneigung aufweisen ("zweidimensionale Gitterenergie"). Nur der Anteil der räumlich einzeln gebundenen Tracermoleküle dissoziiert "normal" ab. In gewissem Widerspruch zu dieser Hypothese steht der Befund, daß bei hohen Tracerkonzentrationen hohe Dissoziationskonstanten vorherrschen und umgekehrt. Möglicherweise sind labile Mehrfachsichten oder Assoziate die Ursache.



Einen wertvollen Hinweis lieferten Experimente von ULRICH [390]. Es wurde gefunden, daß auch bewährte Standard-ELISA-Konfigurationen versagen, wenn statt tensidhaltigem Waschpuffer nur demineralisiertes Wasser verwendet wird. Die Tracerbindung erscheint weitgehend unspezifisch mit nur geringer Analyt-Kompetition. Dies weist darauf hin, daß vor dem ersten Waschvorgang erhebliche Mengen des Tracers unspezifisch, aber relativ lose an der Mikrotiterplattenoberfläche gebunden ist. Erst durch den Tensid-Waschschritt werden spezifisch von unspezifisch gebundenen Tracern tatsächlich getrennt. Hier ist wahrscheinlich eine mechanistische Ursache für die Notwendigkeit der Verwendung von Tween 20 (o.ä.) zu suchen. Der steile Teil der Dissoziationskurven könnte daher auf den "üblichen" Abwascheffekt des unspezifischen Anteils zurückzuführen sein.

Man könnte auch eine "Kern"-Hypothese aufstellen, die postuliert, daß nur immunologisch gebundene Tracer eine freie Fläche "besiedeln" können. Um dieses Tracermolekül (Kern) könnten sich über unspezifische Wechselwirkungen weitere Tracer-Moleküle anlagern, die jedoch nur selten eine Antikörperbindung ausbilden können. Diese unstabilisierten Tracermoleküle ließen sich auch wieder leichter abwaschen.

Die Kern-Tracer-Moleküle zeigen dagegen ein wesentlich langsames Dissoziationsverhalten. Hier wird die Konzentrationsabhängigkeit des Tracers richtig wiedergegeben: Bei niedrigen Konzentrationen (oder Tensidzusatz) bilden sich vorwiegend stabile "Kern"-Komplexe. Bei hohen Tracerkonzentrationen ist genug Substanz für die Ausbildung von "sekundären" Tracer-Komplexen vorhanden.

#### 1.4 Dissoziationskonstanten des Analyten

Noch viel schwieriger erwies sich die Messung der Dissoziation des Antikörper/Analyt-Komplexes. Limitierend war in erster Linie die hohe Dissoziationsgeschwindigkeit, die eine Messung mit "Mikrotiterplatten-Technologie" meist nicht möglich machte. Hier müßten prinzipiell Stopped-Flow- oder Relaxationsmethoden zum Einsatz kommen, was jedoch bei fehlendem direkten Konzentrationsmonitoring kaum möglich sein dürfte.

Aus den hier erhaltenen Meßwerten können zumindest Abschätzungen über die Mindestgröße der Dissoziationskonstante gewonnen werden. So konnte mit dem monoklonalen Antikörper K1F4 und Terbuthylazin nach einer Frist von 3 min kein signifikanter Dissoziationsprozeß mehr gemessen werden (Daten nicht dargestellt). Setzt man eine Reaktion erster Ordnung an, so läßt sich eine Mindestdissoziationskonstante berechnen. Ausgehend von einer Signifikanzgrenze von 5% Inhibition nach einer Dissoziationsdauer von 175 Sekunden (175 s ergeben sich aus der Summe der Waschzeit und der Tracerinkubationszeit) erhält man:  $k_{\text{diss}} = k_{-2} = 0.017 \text{ 1/s}$ . Dies entspricht einer Halbwertszeit von 40 Sekunden oder kürzer.

Beim höher affinen polyklonalen Antikörper C193 und Atrazin konnte mit dieser MTP-Methode noch eine Dissoziation verfolgt werden. Bei der Auswertung dieser Kurven muß

jedoch beachtet werden, daß das exponentielle Verhalten nur indirekt über den Tracer ermittelt wird. Es handelt sich hier also nicht um eine exponentielle Abnahme, sondern um eine Zunahme.

Gemessen wird ein Signal  $S$ , das proportional zum Zerfall des Komplexes ist:

$$S \sim [YA]_0 - [YA] = [YA]_0 - ([YA]_0 \cdot e^{-kt}) \quad (\text{Gl. 32})$$

$$S \sim [YA]_0 \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (\text{Gl. 33})$$

Für das Fitting eignet sich also folgende Gleichung:

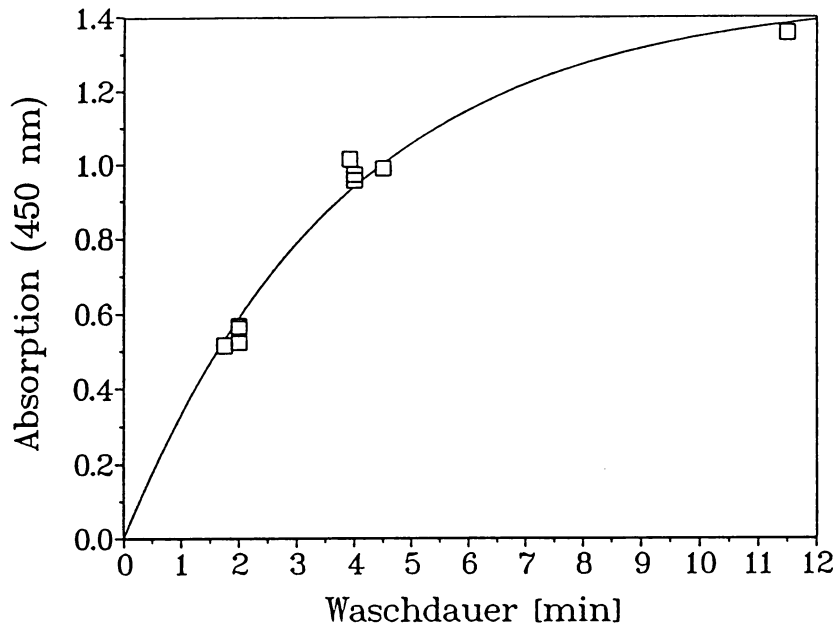
$$S = A \cdot [1 - e^{-kt}] \quad (\text{Gl. 34})$$

mit  $S$                     Signal (Absorption)  
 $t$                     Waschdauer incl. Tracerinkubation (Dissoziationszeit)  
 und den Fitting-Parametern  
 $A$                     maximale Absorption  
 $k=k_2$                 Dissoziationskonstante des Antikörper-Atrazin-Komplexes.

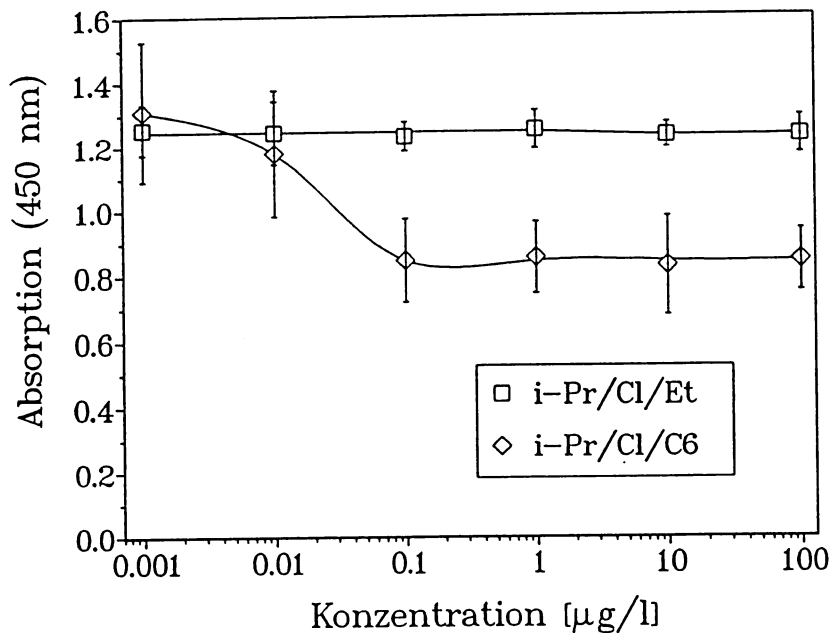
Bei umfangreicherem Datenmaterial könnte man als dritten Parameter eine Nullpunktskorrektur  $t_0$  durchführen, um kleinere Abweichungen des tatsächlichen vom postulierten Waschbeginn auszugleichen.

In Abb. 37 ist der Dissoziationsverlauf des C193-Atrazin-Komplexes dargestellt. Man erkennt, daß zumindest in den ersten 5 Minuten eine Dissoziation zweifelsfrei nachgewiesen werden kann. Die Halbwertszeit beträgt ca. 2.7 Minuten.

Eine Variante des obigen Verfahrens wird in Abb. 38 gezeigt. Hier wurde nicht eine konstante Konzentration vorinkubiert, sondern eine ganze Eichreihe. In Unkenntnis der sehr schnellen Atrazin-Kinetik wurde hier eine Dissoziationszeit von insgesamt 45 Minuten gewählt. Da schon weit über 10 Halbwertszeiten verstrichen sind, ist es nicht verwunderlich, daß es keine Anzeichen einer restlichen Dissoziation beim Atrazin gibt. Dies ist anders beim extrem stark bindenden Derivat i-Pr/Cl/C6. Zur Verringerung der Abweichung durch die Tracerinkubation sollte die Waschzeit (im Gegensatz zum gezeigten Experiment) wesentlich länger als die Tracerinkubationszeit sein. Insofern sind aus Abb. 38 nur ungefähre Werte zu erwarten.



**Abb. 37:** Dissoziation des Komplexes C193-Atrazin. Antikörper: C193 1:10.000, 200  $\mu\text{L}$ , ca. 18 h, RT, Vorinkubation: Atrazin (Wasser) 10  $\mu\text{g/L}$ , 24 h, Zwischenwaschen variabel, Tracer: i-Pr/Cl/C6 1:10.000, 1 min, Entwicklung: 22 min. Fittingparameter  $A=1.45$ ,  $k=k_2=0.0043$  1/s,  $r=0.99$ .



**Abb. 38:** Dissoziation des Komplexes C193-i-Pr/Cl/C6. Antikörper: C193 1:10.000, 200  $\mu\text{L}$ , ca. 18 h, RT, Vorinkubation Atrazin bzw. i-Pr/Cl/C6 (Wasser), 200  $\mu\text{L}$ , 1 h, Zwischenwaschen 5 min, Tracer: i-Pr/Cl/C6 1:10.000, 40 min, Entwicklung 5 min. Halbwertszeit des i-Pr/Cl/C6-Komplexes ca. 27 min.

Die Auswertung erfolgt durch direktes Einsetzen in die Fittingformel

$$A = A_0 \cdot [1 - e^{-kt}] \quad , \quad (\text{Gl. 35})$$

die nach  $k$  aufgelöst wurde:

$$k = \frac{-\ln\left(1 - \frac{A}{A_0}\right)}{t} \quad (\text{Gl. 36})$$

Es ergibt sich aus dem Median des Nullwerts ( $n=3$ ) und dem Median des  $1 \mu\text{g/L}$ -Werts ( $n=3$ ) ein  $k=k_2=0.025 \text{ 1/min}$  bzw.  $0.00042 \text{ 1/s}$ . Dies entspricht einer Halbwertszeit von rund 27 min. Der Wert ist in gutem Einklang mit den Kreuzreaktionsdaten. Da die Gleichgewichtskonstante primär durch die Dissoziationskonstante bestimmt wird (die Assoziationskonstanten sind meist sehr ähnlich), müßte der kinetisch gefundene Faktor 10 zwischen Atrazin und i-Pr/Cl/C6 einen Kreuzreaktionsunterschied vom Faktor 10 (1000%) verursachen. Gemessen wurde eine Kreuzreaktion des i-Pr/Cl/C6-Derivats von 930 % relativ zu Atrazin (siehe S. 202).

Es ist klar ersichtlich, daß diese MTP-Methode ihre technischen Grenzen bei kurzen Zeiten hat. So können schnell dissoziierende Komplexe nicht oder nur ungenau vermessen werden. Hier bietet sich eine sinnvolle Methode zur Abschätzung der Dissoziationskonstante Antikörper/Hapten an, die von der gut meßbaren Gleichgewichtskonstante ausgeht. Da in vielen kinetischen Untersuchungen belegt wurde, daß die Assoziationskonstante ungefähr konstant bleibt, kann eine gute Schätzung der Dissoziationskonstanten aus dem Quotienten aus Assoziationskonstante und Gleichgewichtskonstante erhalten werden. Dies ist auch hilfreich für die Planung von Dissoziationsexperimenten, um die Größenordnung der Zeitachse abzuschätzen.

## 1.5 Assoziationskonstanten

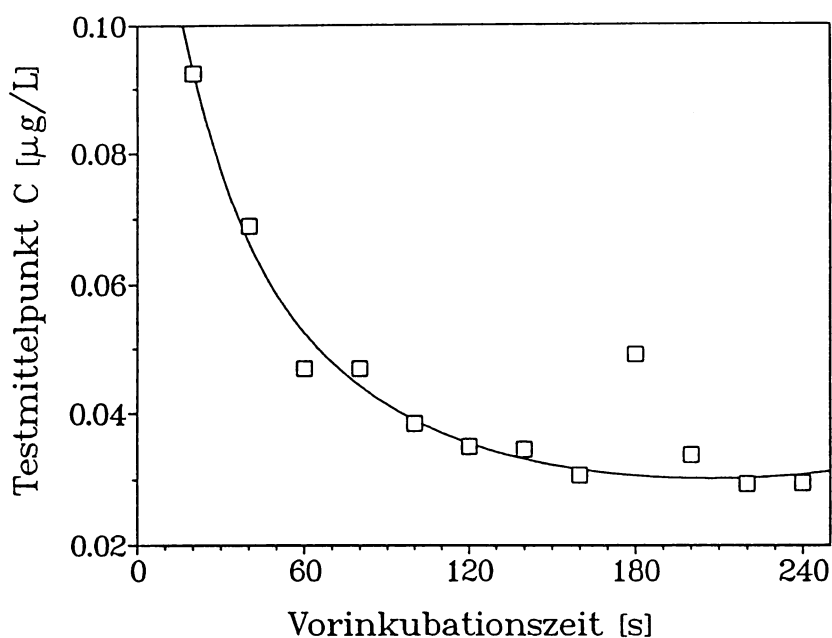
Bei Enzymimmunoassays ist es ziemlich schwierig, Geschwindigkeitskonstanten der Hinreaktion zu berechnen. Weder Tracer- noch die Antikörperkonzentrationen sind genau bekannt. Besser sieht es beim Analyten selbst aus. Hier ist wenigstens die Ausgangskonzentration genau erhältlich. Dafür kompliziert sich die Messung, da ja nur indirekte Meßwerte über den Tracer zugänglich sind.

Zumindest einen qualitativen Eindruck über die Antikörper/Analyt-Assoziationskonstante erhält man durch ein Experiment mit variierenden Vorinkubationszeiten. Es ist offensichtlich, daß bei den betreffenden Konzentrationen (siehe Testmittelpunkt) eine Gleichgewichtseinstellung innerhalb von 2 bis 3 Minuten erfolgt. Das bedeutet, daß bei einem zeitlichen Abstand der Pipettierschritte Analyt und Tracer von mehr als 1 Minute der Test schon als

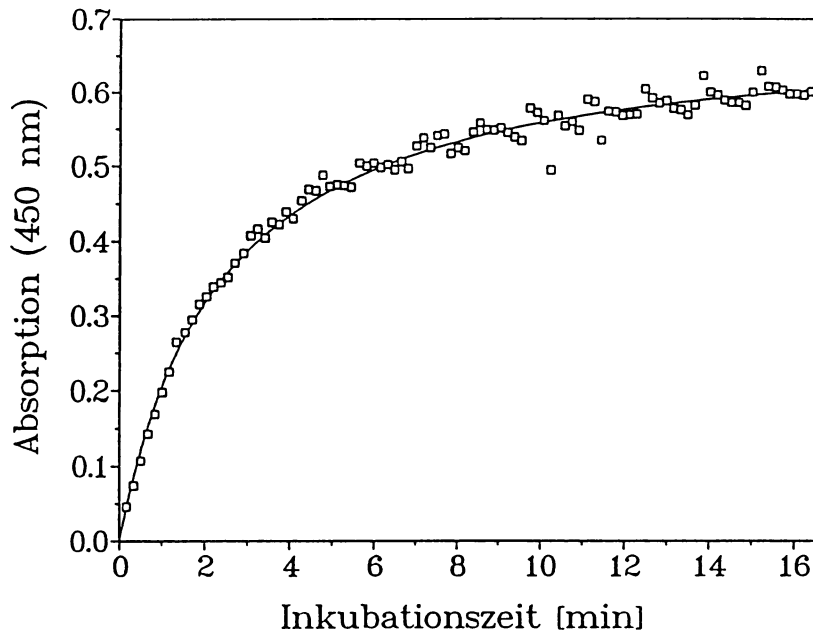
sequentiell eingestuft werden muß. Nur durch Vormischen von Tracer und Probe wäre eine Pseudoäquilibrium-Konfiguration möglich, was aber keine klaren Vorteile bringt (Daten nicht dargestellt). Da zur Berechnung der Assoziationskonstante auch die Antikörperkonzentration erforderlich ist (kein Regime pseudo-erster Ordnung), können die Daten der Abb. 39 nicht quantitativ ausgewertet werden.

Vergleichbare Probleme treten bei der Untersuchung von Antikörper/Tracer-Assoziationsvorgängen auf. Dieser scheinbar einfache und leicht verfolgbare Vorgang ist jedoch kaum so auszuwerten, daß am Ende eine Assoziationskonstante resultiert. Als direktestes Experiment kann man unterschiedliche Tracerinkubationszeiten einsetzen und die daraus resultierende Farbentwicklung messen. Man erhält Kurven wie in Abb. 40.

Nun muß man sich darüber klar werden, welche Vorgänge diese Kurve verursachen. Es ist offensichtlich, daß eine Art Sättigung auftritt, die bei üblichen ELISA-Konzentrationen durch den limitierten Antikörper verursacht wird. Bei einem ausreichenden Tracerüberschuß kann der Ansatz einer Reaktion pseudo-erster Ordnung gemacht werden. Problematisch ist die Frage, ob die Rückreaktion so schnell ist, daß sie berücksichtigt werden muß. Fittingversuche haben gezeigt, daß schon zwei Parameter ausreichen, die gezeigte Kurve mit sehr guten Korrelationskoeffizienten anzupassen. Das bedeutet, daß in dem anzuwendenden Modell nicht mehr als zwei Parameter offen bleiben dürfen. Dies ist jedoch offensichtlich bei einem allgemeinen Modell nicht möglich.



**Abb. 39:** Variation der Vorinkubationszeit. Antikörper: C193 1:10.000, 200  $\mu\text{L}$ , ca. 18 h, RT, Vorinkubation: Atrazin-Lösungen (Wasser), 200  $\mu\text{L}$ , 0.001-1000  $\mu\text{g/L}$ , Tracer: i-Pr/Cl/C6 1:10.000, 100  $\mu\text{L}$ , 2 min, Entwicklung 10 min, die Kurve wurde ohne den Wert bei 180 s gefittet.



**Abb. 40:** Assoziationskinetik Tracer/Antikörper. Antikörper: C193 1:20.000, ca. 18 h, 200  $\mu\text{L}$ , RT, Vorinkubation 100  $\mu\text{L}$  Wasser, 1 h, Tracer: *i*-Pr/Cl/C6 1:10.000 in PBS + 1 g/L BSA, Zeiten um Waschverzögerung korrigiert (2.2 s/Reihe), Entwicklung 5 min.

Betrachtet man den Grenzfall einer langsamen Rückreaktion (vernachlässigbar), dann kann man ein Geschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung ansetzen und integrieren [391].

Aus

$$kt = \frac{1}{[T]_0 - [Y]_0} \ln \left[ \frac{[Y]_0([T]_0 - x)}{[T]_0([Y]_0 - x)} \right] \quad (\text{Gl. 37})$$

ergibt sich durch Auflösen nach  $x$

$$x = \frac{[Y]_0 [1 - \exp([T]_0 - [Y]_0)kt]}{\frac{[Y]_0}{[T]_0} - \exp([T]_0 - [Y]_0)kt} \quad (\text{Gl. 38})$$

Drei Parameter ( $Y$ ,  $T$  und  $k$ ) bedeuten jedoch zu viele Freiheitsgrade für das System. Daher muß mindestens ein Parameter festgelegt werden. Hier bietet sich insbesondere die Tracerkonzentration an. Ungünstigerweise tritt noch ein weiteres Problem auf: Die abhängige Variable  $x$  hat die Einheit [mol/L]. Gemessen wird aber eine Absorption. Bisher konnte noch keine Möglichkeit gefunden werden, Absorptionen direkt in molare Konzentrationen umzurechnen. Zwischen dem gesuchten und dem gemessenen Wert steht der komplexe Vorgang einer heterogenen Enzymreaktion. Es ist möglich, einen weiteren Parameter für das Kurvenfitting einzuführen, der dem Konversionsfaktor zwischen Absorption und Komplexkonzentration

tration entspricht. Dann muß aber eine weitere Konzentration (Antikörper) unabhängig gemessen werden. Auf dieses Problem stößt man auch mit anderen Varianten, bei denen andere Grenzfälle betrachtet bzw. andere Annahmen über den Reaktionsverlauf gemacht werden.

Sollte es aber gelingen, Absolutkonzentrationen des Enzymtracers (z.B. über eine Enzym-Eichkurve) sowie Antikörperkonzentrationen (z.B. indirekt über den Tracer, siehe Abb. 51) zu messen, könnte dieses Verfahren zur Messung von Assoziationskonstanten des Tracers herangezogen werden.

Einfacher ist es, nur die Anfangssteigung der Kurve zu betrachten. Zu Beginn der Reaktion kann man folgende Vereinfachungen machen:

- Keine Rückreaktion
- $[T] = [T]_0 = \text{const.}$
- $[Y] = [Y]_0 = \text{const.}$

Aus einer Reaktion 2. Ordnung wird so formal eine Reaktion pseudo-nullter Ordnung. Es ergibt sich aus

$$\frac{dx}{dt} = k_1 \cdot [T]_0 \cdot [Y]_0 = k' \quad (\text{Gl. 39})$$

integriert

$$x = k' \cdot t \quad (\text{Gl. 40})$$

Gleichung 40 entspricht einer Ursprungsgerade und ist mit der Tangente der Meßkurve identisch. Da hier nur ein Parameter ( $k'$ ) gefittet wird, dürfte diese Methode nur Erfolg versprechen, wenn die Komplexkonzentration direkt vermessen oder sowohl  $[T]_0$  als auch  $[Y]_0$  genau bestimmt werden können.

## 1.6 Gleichgewichtskonstanten

Eine thermodynamische Größe paßt nicht so recht in einen Abschnitt, der von kinetischen Messungen handelt. Da es aber bekanntermaßen einen engen mathematischen Zusammenhang zwischen Assoziations-, Dissoziations- und Gleichgewichtskonstanten gibt, ist die Messung einer Gleichgewichtskonstanten gleichbedeutend mit einer kinetischen Information. Im theoretischen Teil wurden schon ausführlich unterschiedliche Methoden zur Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten dargestellt, auch wenn diese Aufreihung sicherlich nicht vollständig sein konnte.

Gleichgewichtskonstanten Antikörper/Tracer könnten relativ einfach gemessen werden, wäre da nicht das Problem der Adsorption auf der Polystyrolplatte. Diese Wechselwirkung führt dazu, daß bestimmte Fraktionen des Tracers an der Mikrotiterplatte quasi-irreversibel gebunden werden (siehe Abb. 26 ff.). Insofern ist nicht zu erwarten, daß entsprechende Experimente sinnvolle Werte ergeben - besonders da die Kontrolle durch bekannte Referenzwerte fehlt. Zudem ist mit Abweichungen vom idealen Verhalten durch Multivalenz und der Heterogenität von Antikörpern und Tracern zu rechnen. Nicht vergessen sollte man auch die Probleme mit der Bestimmung der Konzentrationen von Edukten und Produkten. Will man jedoch Messungen dieser Art durchführen, so bieten sich Methoden in homogener Lösung an, die in Analogie zur Messung der Gleichgewichtskonstante mit radioaktiven Antigenen durchgeführt werden könnten. Wichtig ist hierbei eine schnelle Trennmethode.

Einen gewissen Ersatz können Messungen der ungekoppelten, reinen Haptene bieten, die wie jeder andere Analyt untersucht werden können. Hier bietet sich im besonderen die später in diesem Abschnitt vorgestellte Methode zur Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten über den 50%-Wert an. Man muß sich jedoch im Klaren sein, daß hier sterische Effekte falsch eingeschätzt werden können. Zur Beurteilung sterischer Probleme ist ein halbquantitatives "Ranking" der Tracer wohl besser geeignet (siehe S. 149).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine vereinfachte Methode zur Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten in Immunoassays zu entwickeln. Ausgangspunkt war die Faustregel, daß der Testmittelpunkt eine Abschätzung der Affinitätskonstante ermöglicht [392].

Diese Regel läßt sich jedoch auch mathematisch begründen. Die Gleichgewichtskonstante  $K$  in einem System, das Analyt  $A$  und Antikörper  $Y$  enthält, ist folgendermaßen definiert:

$$K = \frac{[AY]}{[A][Y]} \quad (\text{Gl. 41})$$

Am Testmittelpunkt oder 50%-Wert gilt:

$$[AY] = [Y] \rightarrow K = \frac{1}{[A]_{50\%}} \quad (\text{Gl. 42})$$

In einem System ohne Tracer kann jedoch in der Regel kein Signal gemessen werden. Somit bleibt auch die Lage des 50%-Werts verborgen. Bei Zugabe eines Tracers  $T$  wird das Gleichgewicht unvermeidlich gestört. Man kann zwar den Testmittelpunkt leicht ermitteln. Dieser Wert ist aber nicht identisch mit dem oben definierten  $[A]_{50\%}$ . Würde man die Gleichgewichtskonstante des Tracers und dessen genaue Konzentration kennen, so könnte man durch Erweiterung der o.g. Formel zu einer exakten Lösung gelangen. Doch dieser Weg ist viel schwieriger als es vielleicht den Anschein haben mag. Die Daten des Tracers sind nur sehr mühsam und relativ ungenau erhältlich.



Es gibt jedoch eine einfachere Lösung, die allgemein anwendbar ist. Setzt man zwei Randbedingungen:

$$[T] \rightarrow 0 \quad \text{und} \quad [Y] \rightarrow 0 \quad (\text{Gl. 43})$$

so läßt sich die Formel direkt lösen:

$$K = \frac{1}{[A]_{50\%}} = \frac{1}{[A]_{0(50\%)}} \quad (\text{Gl. 44})$$

Denn im Grenzfall der infinitesimal niedrigen Tracerkonzentration  $[T]$  wird auch die Störung des Gleichgewichts beliebig klein. Die infinitesimal niedrige Antikörperkonzentration ist notwendig, um  $[A]$  und die bekannte Konzentration  $[A]_0$  gleichsetzen zu dürfen.

Ein mathematischer Grenzübergang ist natürlich etwas anderes als eine reale Messung. Hier können nur endlich große Konzentrationen eingesetzt werden. Problematisch ist hier möglicherweise die Empfindlichkeit des Labels, wenn man sehr genaue Werte der Gleichgewichtskonstanten braucht und folglich sowohl  $[T]$  als auch  $[Y]$  sehr niedrig wählen muß. Schwierig erscheint im ersten Moment auch die Wahl der richtigen Konzentrationen. Dies kann jedoch einfach über eine Verdünnungsreihe geschehen: Der Testmittelpunkt sinkt bei der Verdünnung ab, so lange noch störend hohe Konzentrationen von Tracer und Antikörper verwendet werden. Ab einer bestimmten Konzentration sollte sich keine (meßbare) Erniedrigung des Testmittelpunkts mehr ergeben (asymptotisches Verhalten). Diese Verdünnungsreihe muß zweidimensional, also sowohl für den Tracer, als auch den Antikörper durchgeführt werden. Stößt man an die Nachweisgrenze des Labels, so muß man wohl oder übel die Verdünnungsreihe abbrechen.

Kennt man die Nachweisgrenze des Labels, so kann man abschätzen, welche Affinitätskonstante noch mit einer vorgegebenen Abweichung  $d$  (z.B. 0.01 für 1 %) gemessen werden kann. Ausgangspunkt ist die Überlegung, daß für die Einhaltung der Abweichungsgrenze näherungsweise folgende Bedingungen erfüllt sein müssen:

1. Die Analytkonzentration darf nach der Reaktion mit dem Antikörper nicht mehr als  $d \cdot 100$  % absinken:

$$[YA] = d[A]_0 \quad (\text{Gl. 45})$$

2. und der gebundene Tracer darf nicht mehr als  $d \cdot 100$  % des gebundenen Analyten ausmachen:

$$[YT] = d[YA] \quad (\text{Gl. 46})$$

Am 50%-Punkt (Testmittelpunkt  $C$ ) gilt zudem:

$$[A]_0 = [A]_{0(50\%)} = C \quad \text{und} \quad [YA] = [Y] \quad (\text{Gl. 47})$$

Die Nachweisgrenze des Labels ( $NG_{\text{Label}}$ ) gibt gleichzeitig die Mindestmenge des gebundenen Tracers  $[YT]$  an.

Gleichung 45, 46 und 47 ergeben eingesetzt:

$$C = \frac{1}{K} = \frac{[YT]}{d^2} = \frac{NG_{\text{Label}}}{d^2} \quad (\text{Gl. 48})$$

Aus Gleichung 48 kann man berechnen, welche maximale Affinitätskonstante  $K$  mit einem vorgegebenen Label noch mit der gewünschten Genauigkeit bestimmt werden kann.

Nimmt man z.B. eine Nachweisgrenze des Labels von  $2 \cdot 10^{-15}$  mol/L (Peroxidase, chromogen) und eine Abweichung von 1% ( $d=0.01$ ) an, so erhält man einen Testmittelpunkt  $C$  von  $2 \cdot 10^{-11}$  mol/L (4 ng/L für Atrazin).

Umgekehrt kann man auch den Fehler berechnen, der durch die Benutzung eines bestimmten Labels verursacht wird:

$$d = \sqrt{\frac{NG_{\text{Label}}}{C}} \quad (\text{Gl. 49})$$

So wird bei einem Testmittelpunkt von  $10^{-9}$  mol/L und einer Nachweisgrenze des Labels von  $2 \cdot 10^{-11}$  (Fluoresceinderivat) eine Abweichung von 14% berechnet. Wechselt man das Label aus und verwendet anstelle Fluorescein Peroxidase (s.o.), dann ergibt sich eine Abweichung von 0.14%.

Bei den Gleichungen 48 und 49 ist zu beachten, daß sie nur bei kleinen Fehlern gültig sind, da sonst die Randbedingungen der Herleitung verletzt werden. Zudem müssen sowohl Tracer- als auch Antikörperkonzentrationen optimiert worden sein.

Mit Gleichung 49 kann berechnet werden, ob ein Label bei einem ELISA mit einem bestimmten Testmittelpunkt  $C$  adäquat ist. Wird ein ausreichend kleines  $d$  erhalten, so ist die Konfiguration gut optimiert: Ein Wechsel des Labels ist nicht notwendig.

Günstig an diesem Verfahren ist, daß man einen Mindestwert der Affinitätskonstante erhält. Man weiß auch unabhängig von der obigen Rechnungen in welcher Richtung der Fehler auftritt. Dies kann man auch ausnutzen, um 50%-Werte z.B. aus Literaturangaben in ge-

schätzte Affinitätskonstanten umzuwandeln. Die Affinitätskonstante kann nicht schlechter sein, als der Kehrwert des angegebenen Testmittelpunkts.

Hingewiesen werden soll auf die Tatsache, daß das Konzept von EKINS [288], einen vom Analytvolumen und der Antikörpermenge unabhängigen Immunoassay zu entwickeln, prinzipiell auf analogen Überlegungen beruht. EKINS nennt diese Testkonfiguration "Ambient Analyte Immunoassay" (AAI)<sup>16</sup>. Im Bereich der ELISAs ist es jedoch schon lange üblich, mit ähnlichen Randbedingungen zu messen, im Gegensatz zu RIAs, wo oft hohe Antikörperkonzentrationen vorherrschen.

Eine Komplikation bezieht sich auf das Reagenzienvolumen. Da der Analyt vorinkubiert wird, stellt sich ein Gleichgewicht einer höheren Analytkonzentration ein, wie sie nach der Zugabe des Tracers vorhanden ist. Da der Analyt eine gewisse Zeit braucht, um abzu-dissoziieren, kann sich eine Verfälschung des Werts ergeben. Auf jeden Fall muß bei üblichen Tracerinkubationszeiten der Testmittelpunkt mit dem Verdünnungsfaktor, der durch die Tracerzugabe entsteht, korrigiert werden. Abweichungen kann man auf unterschiedliche Weise minimieren:

1. Volumenverhältnis Analyt/Tracer möglichst groß wählen.
2. Analyt und Tracer vormischen.
3. Tracerinkubationszeit lang wählen (Quasi-Gleichgewicht).

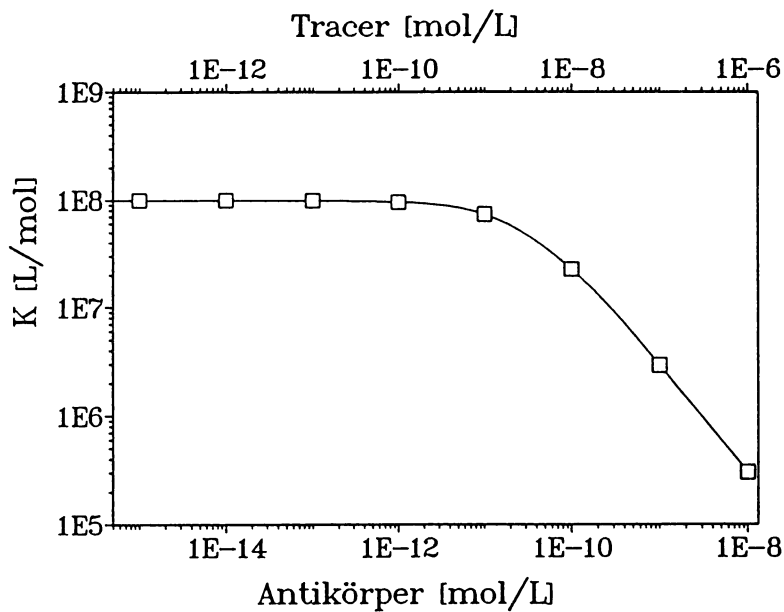
Durch diese Maßnahmen kann man den Fehler, der durch eine Vorinkubation entsteht, fast beliebig klein machen. Auch kann dieser Volumenfehler sehr einfach quantitativ eingegrenzt werden. In weiteren Meßreihen (Daten nicht dargestellt) wurde gefunden, daß Tracerverdünnungsexperimente bei kurzen Inkubationszeiten (15 min) ein Minimum des Testmittelpunkts aufweisen. Kurven, die durch lange Inkubationen (24 h) gewonnen wurden, zeigen zwar ein konvergentes Verhalten zu den Kurzinkubationskurven bei sehr niedrigen Tracerkonzentrationen, die Kurven selbst sind jedoch monoton steigend. Dies unterstreicht den dritten o.g. Punkt. Insbesondere der monoklonale Antikörper K1F4 wurde für diese Untersuchungen benutzt, da hier unabhängig (durch Langmuir-Plot) gewonnene Affinitätskonstanten vorliegen.

Eine besonders elegante Methode zur Überprüfung dieses Konzepts ist die Simulation eines entsprechenden ELISA-Experiments (Abb. 41). Der entscheidende Vorteil dieses Vorgehens liegt darin, daß man in diesem Fall den "wahren" Wert der Gleichgewichtskonstante exakt kennt und nur überprüfen muß, unter welchen Bedingungen dieser Wert reproduziert werden kann. Bei dieser Simulation wurde ein Tracer/Antikörper-Verhältnis von 100:1 verwendet. Die Kurve entspricht einer simultanen Verdünnung von Antikörper und Tracer. Man kann gut erkennen, daß die errechneten Gleichgewichtskonstanten bei zu hohen Konzentrationen zu niedrig liegen und sich bei stärkerer Verdünnung asymptotisch dem "wahren" Wert

---

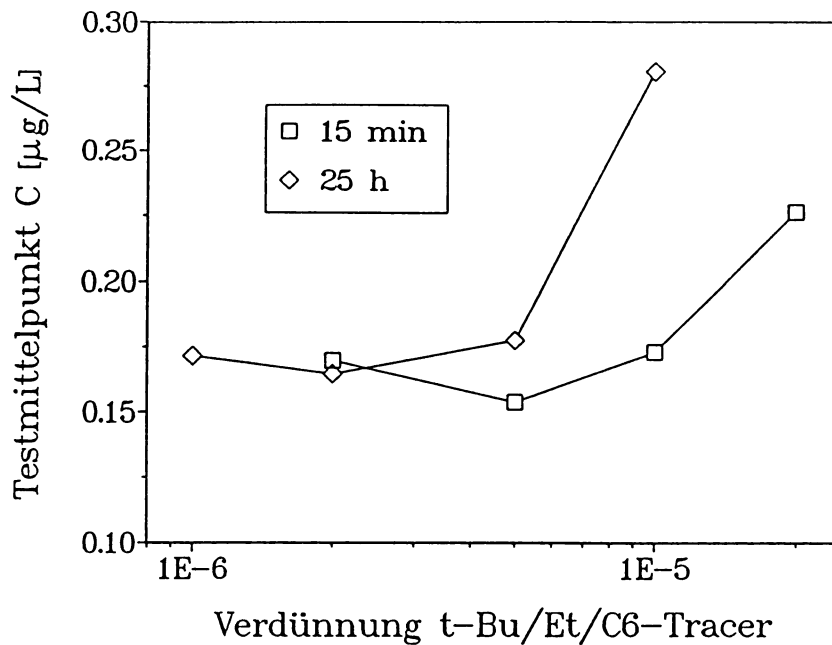
<sup>16</sup>ungefähr: Immunoassay mit umgebendem Analyten

nähern. Ein Volumenkorrekturfaktor (0.6667) wurde genauso berücksichtigt wie im realen Experiment. Es scheint keine prinzipiellen Probleme zu geben, die eine Messung der Gleichgewichtskonstanten mittels der vorgestellten Methode in Frage stellen würde. Im Gegenteil, es ist sogar damit zu rechnen, daß nun weitgehend alle Substanzen, die im ELISA vermessen werden können, auch einer Bestimmung der Affinitätskonstanten zugänglich werden.

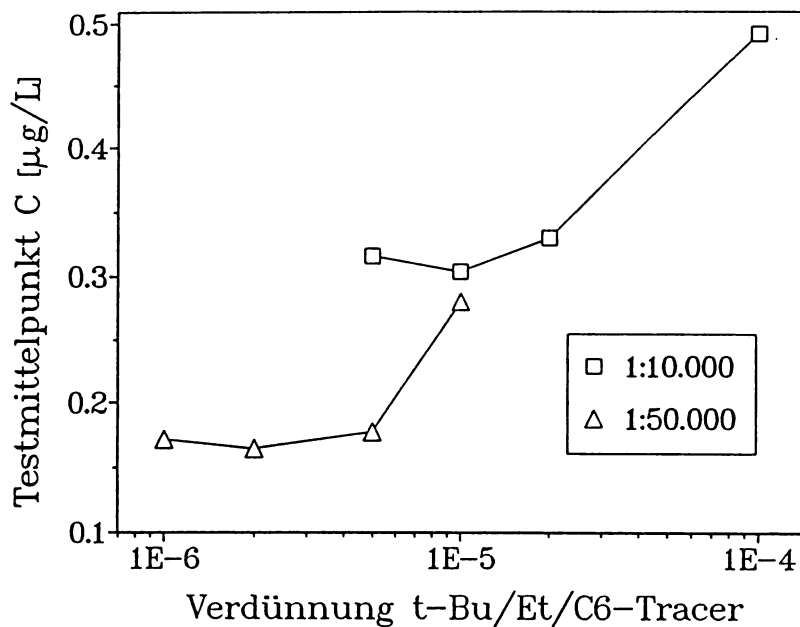


**Abb. 41: Bestimmung der Gleichgewichtskonstante (Simulation).**  $K_{Analyt}=10^8$  L/mol, Gesamtdauer: 18 min, Zeitinkrement: 0.025 s, Tracer:  $k_1=10^7$  L/mol·s,  $k_{-1}=10^{-2}$  1/s, Analyt:  $k_2=10^7$  L/mol·s,  $k_{-2}=10^{-1}$  1/s, Analytzugabe  $t=1$  min, Tracerzugabe  $t=6$  min, Waschen  $t=16$  min bis  $t=18$  min. Volumen: Analyt 200  $\mu$ L, Tracer 100  $\mu$ L.

In Abb. 42 sind zwei typische Tracer-Verdünnungskurven aufgetragen. Sie unterscheiden sich in der Inkubationszeit des Tracers. Um den Verdünnungsfehler klein zu halten, sollte man eher lange Inkubationszeiten wählen. Andernfalls könnten zu niedrige Testmittelpunkte resultieren (hier maximal der Faktor 0.667). Man erkennt sehr schön, daß bei hohen Tracerkonzentrationen eine starke Störung des Gleichgewichts resultiert. Bei kurzen Inkubationszeiten wird das Gleichgewicht nicht ausreichend eingestellt. Daher ist die Störung weniger ausgeprägt. Im Gegensatz zur Isotopenverdünnungsmethode (siehe S. 9) führt jedoch weiteres Verdünnen nicht zu einer beliebigen Empfindlichkeitssteigerung bis zur Nachweisgrenze des Labels. Ab einer Grenzkonzentration des Tracers wird (im Rahmen des Meßfehlers) ein konstanter Testmittelpunkt erhalten. Die in der Bildunterschrift angegebene Schätzung der Gleichgewichtskonstante ist jedoch nur dann mit der thermodynamischen Konstante identisch, wenn die Antikörperkonzentration ausreichend niedrig liegt. Der Testmittelpunkt muß zudem um den Verdünnungsfaktor 0.6667 (200  $\mu$ L + 100  $\mu$ L) korrigiert werden.



**Abb. 42: Tracer-Verdünnungskurve bei zwei Inkubationszeiten.** Antikörper: K1F4 1:50.000 ca. 18 h, 200 µL, Vorinkubation Terbutylazin, 200 µL, 45 min, Tracer: t-Bu/Et/C6, 15 min bzw. 25 h, 100 µL, Entwicklung: ca. 30 min. Testmittelpunkt (bei Verd. 1E-6):  $0.17 \mu\text{g/L} \cdot 0.667 = 0.11 \mu\text{g/L}$  Terbutylazin ( $4.9 \cdot 10^{-10} \text{ mol/L} \rightarrow K = 2.0 \cdot 10^9 \text{ L/mol}$ ).



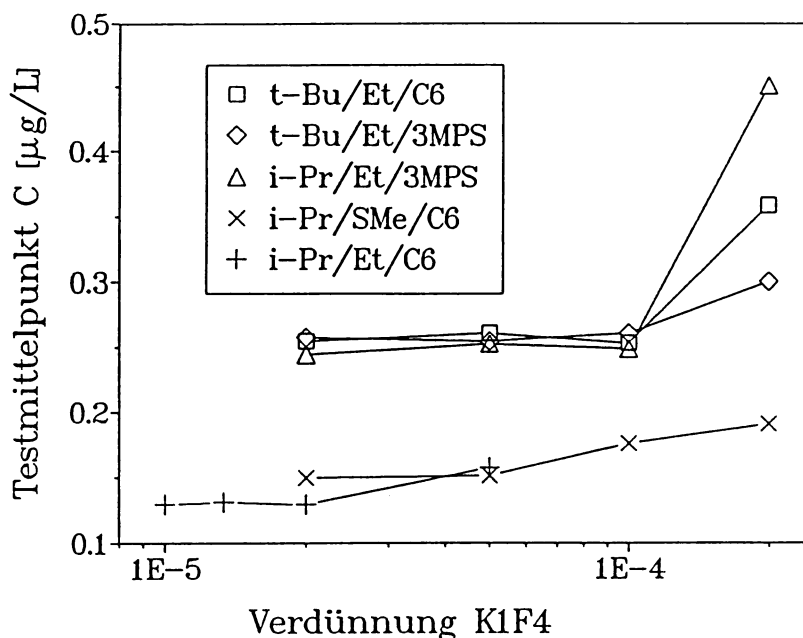
**Abb. 43: Tracer-Verdünnungskurve bei zwei Antikörperverdünnungen.** Antikörper: K1F4 1:10.000 bzw. 1:50.000 ca. 18 h, 200 µL, Vorinkubation Terbutylazin, 200 µL, 45 min, Tracer: t-Bu/Et/C6, 90 min bzw. 25 h, 100 µL, Entwicklung: 5-35 min.

In Abb. 43 sind zwei unterschiedliche Antikörperkonzentrationen gegenübergestellt. Hier erkennt man, daß eine zu hohe Antikörper-Konzentration eine zu hohe Asymptote zur Folge hat. Die Affinitätskonstante wird dann zu niedrig eingeschätzt. Die Antikörperkonzentration muß so lange abgesenkt werden, bis die Asymptote eine konstante Lage erreicht.

Eine genau komplementäre Problematik tritt auf, wenn Antikörper-Verdünnungskurven untersucht werden. Hier stellt sich auch die Frage nach der Art des Tracers, schwach oder stark bindend. Dies hängt auch eng mit der Fragestellung zusammen, ob Tests mit schwach bindenden Tracern empfindlicher gemacht werden können.

Die Kurvenschar in Abb. 44 ist nicht einfach zu interpretieren. Auf den ersten Blick könnte man annehmen, daß schwach bindende Tracer (vergleiche S. 162) zu niedrigeren Testmittelpunkten führen. Dies erscheint auch einleuchtend, da Tracer mit höheren Affinitätskonstanten bei gleicher Konzentration das Analyt/Antikörper-Gleichgewicht stärker stören. Da jedoch Tracer in individuell optimierten Konzentrationen eingesetzt werden, ist dieser Vergleich nur bedingt statthaft. Man kann nämlich genauso leicht nachweisen, daß die höhere Affinität eines Tracers durch eine niedrigere Konzentration ausgeglichen werden kann (im idealen Gleichgewichtsfall). Möglicherweise ist Abb. 44 so zu erklären, daß die höheraffinen Tracer in einer ungeeignet hohen Konzentration eingesetzt wurden. Dies kann durch weitere Messungen (Daten nicht dargestellt) untermauert werden, da bei sehr hohen Verdünnungen, auch bei "hochaffinen" Tracern vergleichbar niedrige Testmittelpunkte erreicht wurden (siehe auch Abb. 43).

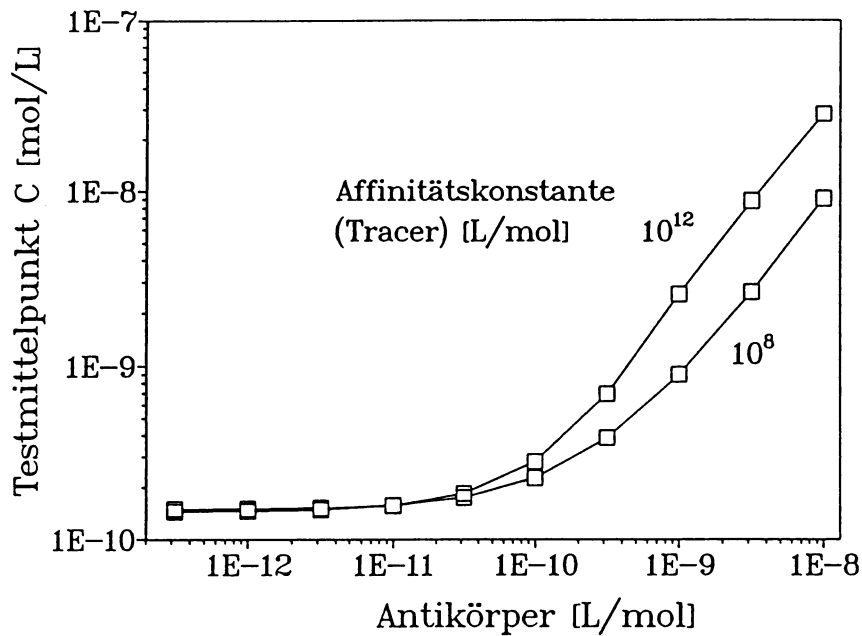
Eine etwas ungewöhnlichere Interpretation könnte darauf basieren, daß der verwendete monoklonale Antikörper nicht im molekularen Sinne einheitlich war. Von anderen Experimentatoren [393] wurden Hinweise auf sog. Isoformen von monoklonalen Antikörpern gefunden. Es gibt deutliche Anhaltspunkte, daß Hybridomazellen ein Gemisch von drei Isoformen monoklonaler Antikörper produzieren können, die auf einer Heterogenität der leichten Ketten (zwei Formen) bzw. schweren Ketten (zwei Formen) basiert [394]. Ob eine doppelte Kombination (zwei leichte und zwei schwere Ketten) vorkommen kann, ist nicht bekannt. In diesem Fall wären vier Formen der Bindungsstellen zu erwarten. Zudem stellt sich dann die Frage, ob auch chimäre Antikörper produziert werden. Dies würde die Heterogenität noch weiter vergrößern. Möglicherweise ist die schlechte Kristallisierbarkeit von monoklonalen Antikörpern nicht nur auf den Kohlenhydratanteil, sondern auf eine strukturelle Heterogenität der Proteinketten zurückzuführen. Diese Beobachtungen sind insofern für Immunoassays wichtig, da nach einer präparativen Trennung der Isoformen festgestellt wurde, daß sich die "Immunologische Aktivität" (relative Affinitätskonstante ?) der Isoformen um den Faktor 50 unterscheiden kann. Es gibt jedoch auch Hybridomazellen, die einheitliche Antikörper produzieren. Man kann daraus schließen, daß man die Einheitlichkeit von monoklonalen Antikörpern z.B. mittels SDS-PAGE überprüft werden sollte, falls die Monoklonalität wichtig für das betreffende Experiment sein sollte. Andernfalls muß man damit rechnen, mit "triklonalen" Antikörpern zu arbeiten. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörpern wurde die molekulare Einheitlichkeit nicht explizit nachgewiesen.



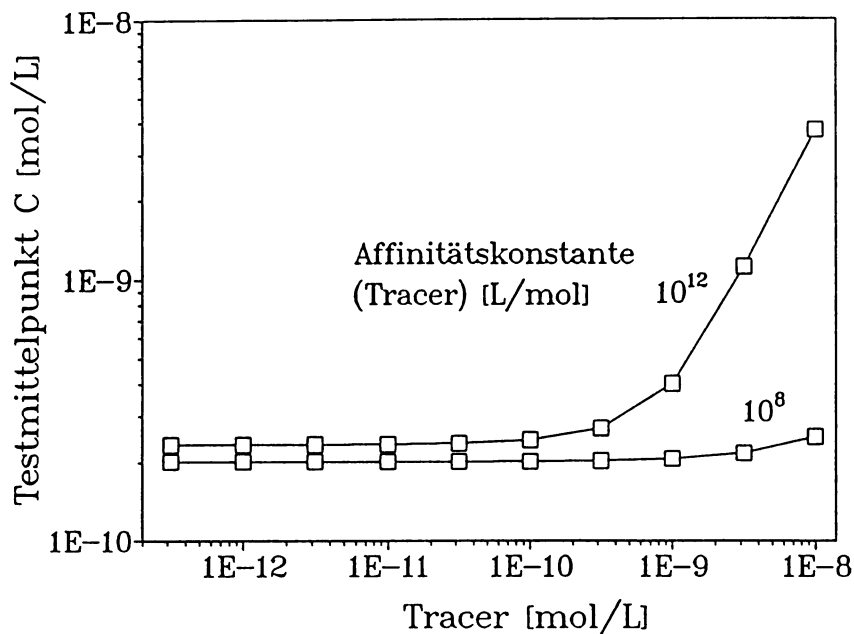
**Abb. 44:** Antikörper-Verdünnungskurven mit 5 Tracern. Antikörper: K1F4 200 µL ca. 18 h, Vorinkubation: Terbutylazin 200 µL, 1 h, Tracer: 100 µL, t-Bu/Et/C6 1:20.000, i-Pr/Et/3MPS 1:500.000, t-Bu/Et/3MPS 1:200.000, i-Pr/Et/C6 1:20.000, i-Pr/SMe/C6 1:20.000, je 15 min, Entwicklungszeiten und max. Absorpt. bei AK-Verd. 1:50.000 (in obiger Reihenfolge): 40 min, 1.7, 30 min, 0.31, 30 min, 0.2, 40 min, 0.22, 30 min, 0.5.

Weitgehend aufgeklärt wird der Sachverhalt in Abb. 44 durch die in Abb. 45 dargestellte Simulation. Es ist klar ersichtlich, daß durch unterschiedliche Affinitätskonstanten des Tracers (genauer: Dissoziationskonstanten) keine signifikanten Unterschiede in der Verdünnungstangente erhalten werden. Die Variation umfaßt 4 Dekaden. Dies bedeutet, die unterschiedlichen Tangenten in Abb. 44 wurden wahrscheinlich durch unterschiedliche Tracerkonzentrationen verursacht. Zwar liegt die Kurve des niedrigaffinen ( $10^8$  L/mol) unter der des hochaffinen Tracers, die Differenz ist jedoch nicht bedeutend. Besonders wenn man weiß, daß man die Erniedrigung der Affinitätskonstante um  $10^4$  mit einer Signaleinbuße (A-D) um den Faktor  $10^7$  erkaufte (Daten nicht dargestellt). Man kann daraus schließen, daß man keinen speziellen Tracer benötigt, um Gleichgewichtskonstanten über die Tangente der Antikörper-Verdünnung zu bestimmen. Alle Tracer ergeben denselben Grenzwert.

Eine interessante Beobachtung kann man beim Steigungsparameter B machen. Hier zeigt sich, daß bei niedrigen (üblichen) Antikörper-Konzentrationen eine Steigung von ca. 1 erhalten wird. Bei hohen Antikörperkonzentrationen nimmt die Steigung stark zu. Bei einer Antikörperkonzentration von  $10^{-8}$  mol/L und  $k_{-1} = 10^{-5}$  sowie den in Abb. 46 angegebenen Simulationsparametern wurde eine Steigung von über 4 errechnet.



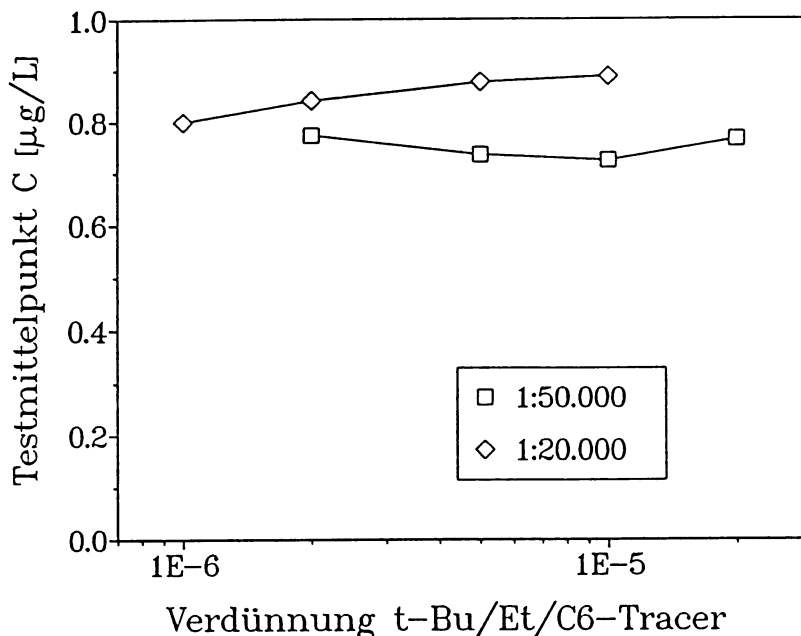
**Abb. 45: Antikörper-Verdünnungskurven (Simulation).** Gesamtdauer: 18 min, Zeitinkrement: 0.025 s, Tracer:  $k_1=10^7$  L/mol·s,  $k_{-1}=10^{-1}$  1/s bzw.  $k_{-1}=10^{-5}$  1/s,  $[T]_0=10^{-12}$ , Analyt:  $k_2=10^8$  L/mol·s,  $k_{-2}=10^{-2}$  1/s, Analytzugabe  $t=1$  min, Tracerzugabe  $t=6$  min, Waschen  $t=16$  min bis  $t=18$  min. Volumen: Analyt 200  $\mu$ L, Tracer 100  $\mu$ L.



**Abb. 46: Tracer-Verdünnungskurven (Simulation).** Gesamtdauer: 18 min, Zeitinkrement: 0.025 s, Tracer:  $k_1=10^7$  L/mol·s,  $k_{-1}=10^{-1}$  1/s bzw.  $k_{-1}=10^{-5}$  1/s,  $[Y]_0=10^{-10}$ , Analyt:  $k_2=10^8$  L/mol·s,  $k_{-2}=10^{-2}$  1/s, Analytzugabe  $t=1$  min, Tracerzugabe  $t=6$  min, Waschen  $t=16$  min bis  $t=18$  min. Volumen: Analyt 200  $\mu$ L, Tracer 100  $\mu$ L.



Einen prinzipiell ähnlichen Verlauf zeigt Abb. 46. Auch hier ist die Kurve des schwach bindenden Tracer unterhalb der des stark bindenden. Die Differenz der Tangenten ist hier zwar etwas größer, dies könnte aber auf die höhere Antikörperkonzentration relativ zur Tracerkonzentration in Abb. 45 zurückzuführen sein. Es ist auch in diesem Fall davon auszugehen, daß alle Tracer bei ausreichend niedrigen Konzentrationen (Tracer und Antikörper) den gleichen Testmittelpunkt ergeben.



**Abb. 47:** Bestimmung der Gleichgewichtskonstante von Atrazin und mAK KIF4. Antikörper KIF4 1:20.000, 200 µL, ca. 18 h, Vorinkubation Atrazin 200 µL, 20 min, Tracer t-Bu/Et/C6 s.o., 100 µL, 15 min, Entwicklung 15-35 min. Antikörper KIF4 1:50.000, 200 µL, ca. 18 h, Vorinkubation Atrazin 200 µL, 30 min, Tracer t-Bu/Et/C6 s.o., 100 µL, 15 min, Entwicklung 18-40 min. Testmittelpunkt C (KIF4 1:50.000, Tracer 1:500.000) = 0.78 µg/L · 0.667 = 0.52 µg/L Atrazin ( $2.4 \cdot 10^{-9}$  mol/L  $\rightarrow$   $K = 4.1 \cdot 10^8$  L/mol).

In Abb. 47 ist exemplarisch die Bestimmung einer Affinitätskonstante dargestellt. Der Testmittelpunkt der niedrigsten Antikörperverdünnung und der niedrigsten Tracerverdünnung wurde in molare Konzentrationen umgerechnet. Der Kehrwert von C ist die Affinitätskonstante K. Nach Gleichung 49 erhält man mit einer Nachweisgrenze der Peroxidase von ca.  $10^{-14}$  mol/L eine minimale Abweichung von 0.05 %. Der Gesamtfehler wird also primär durch den Fehler bei der Messung des Testmittelpunkts bestimmt und nicht durch die Empfindlichkeit des Labels und liegt damit im Bereich einer üblichen ELISA-Messung (erfahrungsgemäß ca. 5%).

Um einen direkten Vergleich mit Literaturwerten zu ermöglichen, wurde auch Atrazin als Analyt vermessen. Da für seltenere Triazine radioaktive Derivate nicht gut zugänglich sind, liegen nur für Atrazin Literaturdaten vor (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Bestimmung der Gleichgewichtskonstante - Vergleich der Verfahren.**

Antikörper	Analyt	$K_{Lit.}^1$	Zitat	$K_{neu}$	Bemerkungen
K1F4	Atrazin	$3.9 \cdot 10^7$	[201]	$4.1 \cdot 10^8$	siehe Abb. 47
AK 15	Atrazin	$3 \cdot 10^7$	[191]	$7.9 \cdot 10^7$	aus [395] <sup>2</sup>
C193	Atrazin	$1.1 \cdot 10^7$	[194]	$1.4 \cdot 10^{10}$	aus [285] <sup>3</sup>
C190	Atrazin	$8.6 \cdot 10^6$	[371]	$2.7 \cdot 10^9$	aus [395] <sup>4</sup>
C2	Atrazin	$1.2 \cdot 10^7$	[194]	$1.3 \cdot 10^7$	aus [194] <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Werte, die durch Langmuir-Plot-Analyse [395] von Präzipitationsverfahren erhalten wurden.

<sup>2</sup> Berechnung nach dem hier vorgestellten Verfahren aus den angegebenen Testmittelpunkten (mit Volumenkorrektur).

<sup>3</sup> Berechnung nach dem hier vorgestellten Verfahren aus den angegebenen Testmittelpunkten (ohne Volumenkorrektur, da nur 1 min Tracerinkubationszeit).

<sup>4</sup> Berechnung nach vorgestellten Verfahren, Abschätzung des Testmittelpunkts aus Eichkurve (mit Volumenkorrektur).

Es fällt sofort auf, daß die mit der Ammoniumsulfat-Präzipitationstechnik gewonnenen Daten ( $K_{Lit.}$ ) sehr ähnlich sind und keine nennenswerte Differenzierung zwischen den Antikörpern ermöglichen. Die extreme Überlegenheit des Antikörpers C193 (bzgl. Sensitivität) läßt sich mit dieser Methode nicht nachweisen. Die Diskrepanzen können nicht nur auf die oft strapazierte Heterogenität der polyklonalen Antikörper zurückgeführt werden. Auch beim monoklonalen Antikörper K1F4 wurde eine unrealistische Affinitätskonstante erhalten. Die Werte wurden teilweise schon von den Autoren angezweifelt. Es wurde vermutet, daß die geringe spezifische Aktivität des  $^{14}\text{C}$ -Derivats die Messung höherer Affinitätskonstanten nicht erlaubt. Der Vorschlag, das sensitiv nachweisbare  $^{125}\text{I}$  zu verwenden, dürfte nur sehr begrenzt realisierbar sein. Da dies im Gegensatz zum  $^{14}\text{C}$  (oder  $^3\text{H}$ ) ein externes Label darstellt, sind erhebliche Veränderungen im Molekül nicht zu umgehen. Es würde daher nicht mehr die Affinitätskonstante des Analyten Atrazin gemessen, sondern die eines iodierten Derivats von mäßigem Interesse.

Die Werte, die mit der hier präsentierten Methode erhalten wurden, erscheinen sehr gut differenziert. Da der "wahre" Wert natürlich unbekannt ist und die "Referenzmethode" (Präzipitation) fragwürdige Daten ergibt, kann man vorerst nur auf Plausibilität prüfen. Die neuen Gleichgewichtskonstanten entsprechen jedoch sehr gut den Erwartungen. Kann man auch die Richtigkeit dieser Werte nicht direkt untersuchen, so ist die 50%-Methode offensichtlich der Präzipitationsmethode aus vielen Gründen vorzuziehen. Die Einfachheit der Messung würde es sogar erlauben, auf die Angabe von Kreuzreaktionen völlig zu verzichten und nur noch die Affinitätskonstanten anzugeben. Dies hätte zudem den Vorteil, daß die Werte auch im etwas engeren Sinne eine Konstante darstellten und nicht nur bei einer Testkonfiguration gültig wären.

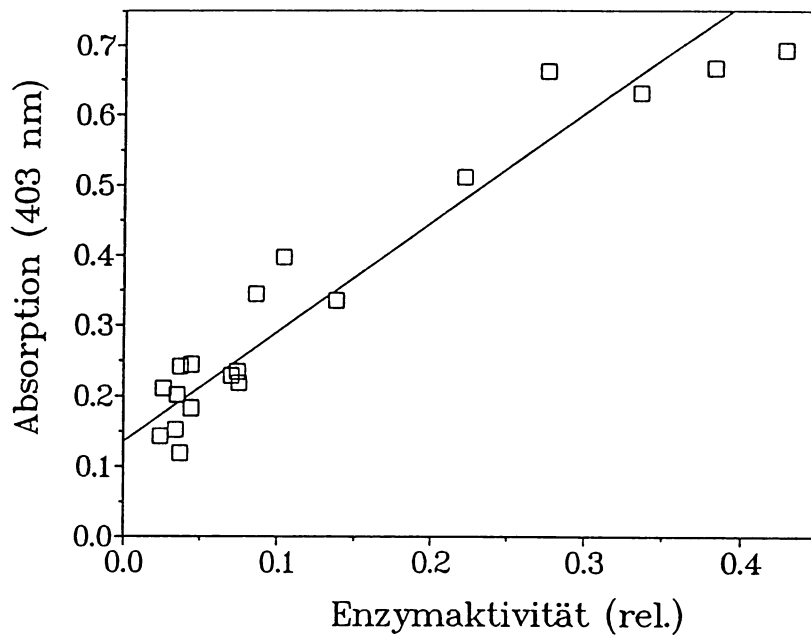
Die Problematik der immobilisierten Antikörper kann hier nicht endgültig entschieden werden. Prinzipiell werden hier nur "scheinbare" Gleichgewichtskonstanten erhalten, da nicht in homogener Lösung gearbeitet wird. Die offensichtlichen Schwächen der "Standardmethoden" lassen jedoch vermuten, daß die Meßfehler bei diesen Methoden so hoch sind, daß eine Diskussion über thermodynamische und "scheinbare" Gleichgewichtskonstanten rein akademisch wird und sich bisher durch keine signifikanten Daten untermauern läßt.

### 1.7 Konzentrationsmessungen

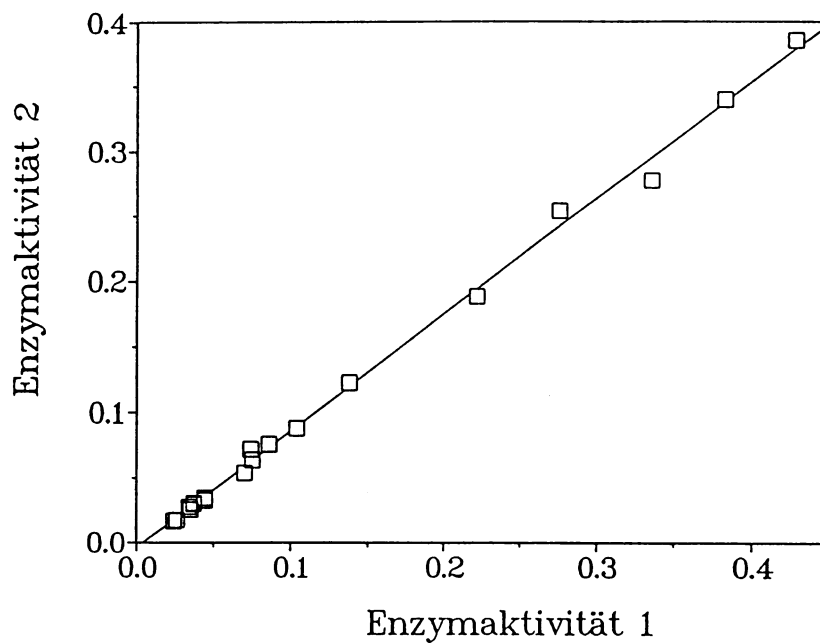
Zur Konzentrationsmessung von Peroxidase wurden zwei unabhängige Methoden eingesetzt. So wurde über die Absorptionsbande bei 403 nm (Soret-Bande) und die in der Literatur veröffentlichten molaren Absorptionskoeffizienten die molaren Konzentrationen ermittelt. Dies bezieht sich jedoch auf eine Summe von aktiven und inaktiven Tracermolekülen. Zumindest die enzymatisch nicht aktiven Tracer-Moleküle werden ausgeschieden, wenn man nicht die Absorption, sondern direkt einen Test der Enzymaktivität vornimmt.

In Abb. 48 ist eine Korrelation zwischen Enzymaktivität und Soret-Absorption aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient ist nicht sehr hoch. Dies deutet darauf hin, daß die Absorptionsmessung und die Aktivitätsmessung tatsächlich in gewissem Umfang entkoppelt sind. Besonders der positive Ordinatenabschnitt zeigt deutlich, daß es eine Spezies des Tracers geben muß, die zwar eine Absorption bei 403 nm besitzt, aber keine oder nur geringe Enzymaktivität aufweist. Möglicherweise ist die Absorptionsmessung bei frischen Konjugaten adäquat. Auf diese Weise könnte auch von jedem Tracer eine Absolutkonzentration angegeben werden. Die spätere Kontrolle der Tracer sollte jedoch bevorzugt durch die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgen, da nur so Qualitätseinbußen quantifizierbar sind.

In Abb. 49 sind zwei unabhängige Messungen der Enzymaktivität von 19 unterschiedlichen Peroxidase-Tracern gegeneinander aufgetragen. Die hervorragende Korrelation (0.999) zeigt, daß diese Methode reproduzierbare Werte ergibt. Die Steigung  $< 1$  resultiert nur daraus, daß keine Absolutwerte gewonnen werden. Da die Messung zudem mit geringem Aufwand durchgeführt werden kann, erscheint die Aktivitätsmessung für die Qualitätskontrolle von Peroxidase-Konjugaten besonders empfehlenswert. Es gibt daher keinen Grund, die regelmäßige Überprüfung von Enzym-Konjugaten zu meiden. Die Quantifizierung der Enzymaktivität kann dazu beitragen, ELISAs so verläßlich zu gestalten, daß auch Routineprojekte problemlos durchgeführt werden können.

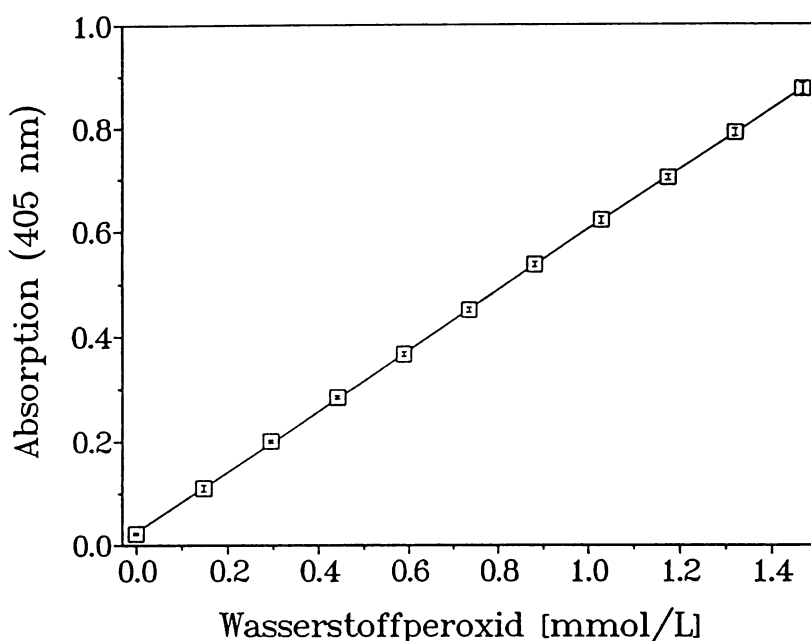


**Abb. 48:** Korrelationsdiagramm Enzymaktivität gegen Absorption.  $Y = A + BX$ ,  $r = 0.961$ ,  $A = 0.151$ ,  $B = 1.44$ , Enzymaktivität siehe Abb. 49, Abb. 122, Absorption: 403 nm, 1 cm-Mikroküvette.



**Abb. 49:** Korrelation Enzymaktivität 1 gegen Enzymaktivität 2. Zwei unabhängige Messungen der Enzymaktivität,  $Y = A + BX$ ,  $r = 0.999$ ,  $A = -0.0036$ ,  $B = 0.895$ , Tracer ( $A_{403}$  ca. 0.5), 1:100.000 in PBS (100 mg/L BSA) (2 Stufen, 1:200, 1:500), 100  $\mu\text{L}$  in Mikrotiterplatte, 200  $\mu\text{L}$  Substratlösung zugeben, kinetische Aktivitätsmessung (620 nm, Referenz 492 nm), 30 Meßpunkte, Zeitinkrement 20 s, Median einer Dreifachbestimmung.

Die Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration im Substrat ist insofern wichtig, da zu niedrige Konzentrationen zu langsamer Farbentwicklung und zu hohe zu einer schnellen Inhibition der Peroxidase führen. Daher ist die Einhaltung des Konzentrationsoptimums eine häufige Aufgabe bei der Durchführung von peroxidaseabhängigen Immunoassays. Die quantitative Bestimmung von Wasserstoffperoxid ist ein klassisches Problem der volumetrischen Analyse. Sie kann durch Cerimetrie, Manganometrie oder Iodometrie erfolgen [396][397], wobei letztere die verlässlichsten Werte liefern soll. Schneller und bequemer dagegen ist das photometrische Verfahren mit Titanoxidsulfat [398]. Die in Abb. 50 dargestellte Eichgerade zeigt in unmißverständlicher Weise, daß nicht nur biochemische Verfahren in Mikrotiterplatten durchgeführt werden können. Fast alle photometrischen Verfahren können mit geringen Abwandlungen an dieses Format adaptiert werden. Die hohe Anzahl von Replikaten und Proben machen dies entsprechend attraktiv. Diese Eichgerade unterstreicht auch die hohe Genauigkeit von MTP-Readern, die in Immunoassays kaum je fehlerlimitierend sein dürften.



**Abb. 50:** Eichgerade zur  $H_2O_2$ -Bestimmung mit Titanoxidsulfat.  $r = 0.99997$ ,  $n = 8$  (pro Konzentration), Fehlerbalken  $2s$ ,  $Y = A + BX$ ,  $A = 0.02555$   $B = 0.5807$ , Fehlerbalken:  $2s$ ,  $16$  mL Probe +  $4$  mL Titanoxidsulfatlösung,  $5$  min,  $300$   $\mu$ L pro Kavität, Messung MTP-Reader  $405$  nm ( $620$  nm Referenz). Die Stammlösung wurde iodometrisch eingestellt.

Die Bestimmung der Antikörper-"Konzentration" bzw. Menge ist nur über indirekte Methoden möglich. Direkte Tests, wie Protein- oder IgG-Bestimmungen führen bei polyklonalen Antikörpern zu falschen, bei monoklonalen zumindest zweifelhaften Werten. Über die oben beschriebenen Methoden läßt sich die Konzentration des Peroxidase-Tracers relativ gut bestimmen. Mit einer "Titration" der Antikörperbindungsstellen auf einer Mikrotiterplatte mittels eines hochaffinen Tracers bekannter Konzentration sollte sich die (aktive) Antikörper-

menge bestimmen lassen. In Abb. 51 ist eine entsprechende Eichkurve aufgetragen. Man erkennt sehr schön einen klaren "Knick", der die Sättigung anzeigt. Die Tracerkonzentration am "Knick" sollte in etwa mit der Konzentration der Antikörper korrelieren. Da von dem hier verwendeten Tracer keine genauen Konzentrationsdaten vorliegen, muß man sich auf eine Abschätzung beschränken.

Ausgehend von einer geschätzten Tracerkonzentration von  $2.3 \cdot 10^{-5}$  mol/L erhält man für die "Knick"-Konzentration  $1.6 \cdot 10^{-9}$  mol/L. Für  $200 \mu\text{L}$  bedeutet dies  $3.2 \cdot 10^{-13}$  mol Tracer pro Kavität. Bei einer Ausbildung von 1:1-Komplexen folgert man  $3.2 \cdot 10^{-13}$  mol aktive Antikörper. Mit einer Molmasse von 160.000 erhält man  $5.1 \cdot 10^{-8}$  g aktive Antikörper pro Kavität. Bei einer Oberfläche von ca.  $1.7 \text{ cm}^2$  (gerechnet für  $200 \mu\text{L}$  Füllinhalt) bestimmt man die Antikörperdichte mit  $3.0 \cdot 10^{-8} \text{ g/cm}^2$  oder  $1.9 \cdot 10^{-13} \text{ mol/cm}^2$  bzw.  $1.1 \cdot 10^{11}$  Antikörper/cm<sup>2</sup>. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den Werten von TUISSEN [399] (max.  $1.5 \cdot 10^{-7} \text{ g/cm}^2$ ,  $1 \cdot 10^{-12} \text{ mol/cm}^2$ ), wenn man für polyklonale Antikörper einen Korrekturfaktor von ca. 0.1 berücksichtigt.

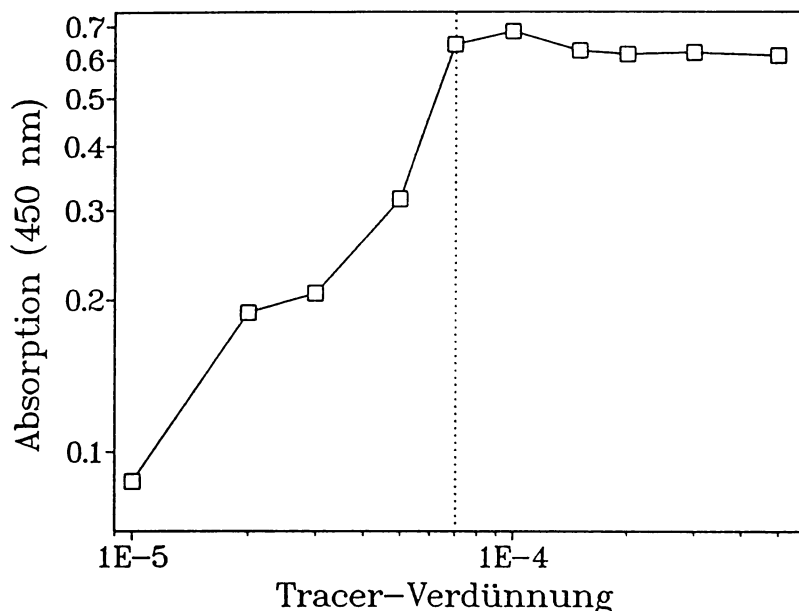


Abb. 51: Titration der Antikörperbindungsstellen mit POD-Tracer. Antikörper: C193 1:20.000,  $200 \mu\text{L}$ , ca. 18 h, RT, Tracer: *i*-Pr/Cl/C6, 45 h, RT, Entwicklung 5 min.

Die identische Meßkurve kann auch zur Bestimmung der Affinitätskonstante des Tracers herangezogen werden. Vernachlässigt man die Probleme mit Adsorptionen an der Mikrotiterplatte, so kann eine Methode von ODELL et al. [400] verwendet werden, die auf der Basis der Michaelis-Menten-Gleichung beruht. So entspricht die Sättigungstangente dem Parameter  $V_{\text{max}}$  und die Affinitätskonstante dem Parameter  $K_M$ . In Abb. 51 entspricht der  $K_M$ -Wert ungefähr einer Tracerverdünnung von  $5 \cdot 10^{-5}$  und nach den obigen Abschätzungen einer Affinitätskonstante von ca.  $10^9 \text{ L/mol}$ . Dieser Wert dürfte ca. zwei Zehnerpotenzen zu

niedrig liegen (siehe i-Pr/Cl/C6 auf S. 141). Die Ursachen können vielfältig sein. Eine naheliegende Erklärung geht von der Tatsache aus, daß mit diesem Verfahren nicht die maximale, sondern eine mittlere (intrinsische) Affinitätskonstante gemessen wird, die jedoch für den ELISA nur von geringer Relevanz ist. Auch hier ist jedoch eine genaue Bestimmung der Tracerkonzentration Voraussetzung für genaue Affinitätskonstanten.

Für die Messung der Antikörper- (und Tracer-) Konzentration würde sich auch ein nicht-kompetitiver Immunoassay gut eignen [221]. Voraussetzung ist jedoch die Zugänglichkeit eines Standardreferenzmaterials bzw. eines Analyten bekannter Konzentration. Auch ohne genaue Standards wäre auf diese Weise zumindest eine Normierung der Konzentrationen leicht möglich.

### 1.8 Adsorption und Desorption von Antikörpern

Auf der reproduzierbaren Adsorption von Antikörpern oder anderen Immunreagenzien auf Oberflächen beruhen alle heterogenen Immunoassays. Daher muß diesem Vorgang entsprechende Aufmerksamkeit zuteil werden.

Die nächste Graphik (Abb. 52) zeigt einen Coating-Verlauf bei Raumtemperatur. Man erkennt die ausgeprägte Zeitabhängigkeit, die sich im Stunden-Bereich abspielt. Zwar ist nach 7 Stunden immer noch kein Gleichgewicht erreicht, aber auch nach 2 bis 3 Stunden ist schon der überwiegende Anteil gebunden. Abgesehen von der Verschwendung teurer Antikörper spricht nichts dagegen, eine Beschichtung mit höherer Konzentration in kürzerer Zeit durchzuführen.

Der umgekehrte Prozeß, die Desorption von Antikörpern von der Mikrotiterplatte ist in der Regel unerwünscht. Die oft geäußerte Vermutung, die nicht kovalent gebundenen Antikörper könnten bei nachfolgenden Schritten teilweise desorbieren, mußte einer Überprüfung unterzogen werden.

Abb. 53 zeigt das Resultat eines Experiments zur Stabilität der Antikörper-Immobilisierung auf Polystyrolplatten. Es ist unschwer ersichtlich, daß nach einem 4fachen Vorwaschen keine weiteren Antikörperverluste durch Desorption zu befürchten sind, obwohl der Waschpuffer das Tensid Tween 20 enthält. Antikörperverluste könnten z.B. Dissoziationsexperimente stark verfälschen. Man kann auch ablesen, daß im getesteten Fall 4 Waschschriffe angemessen und hinreichend für einen optimalen Testverlauf sind. Es scheinen auch nach 24 Waschschriffen keine Denaturierungstendenzen aufzutreten, die sich in dieser Messung gleichfalls bemerkbar gemacht hätten.

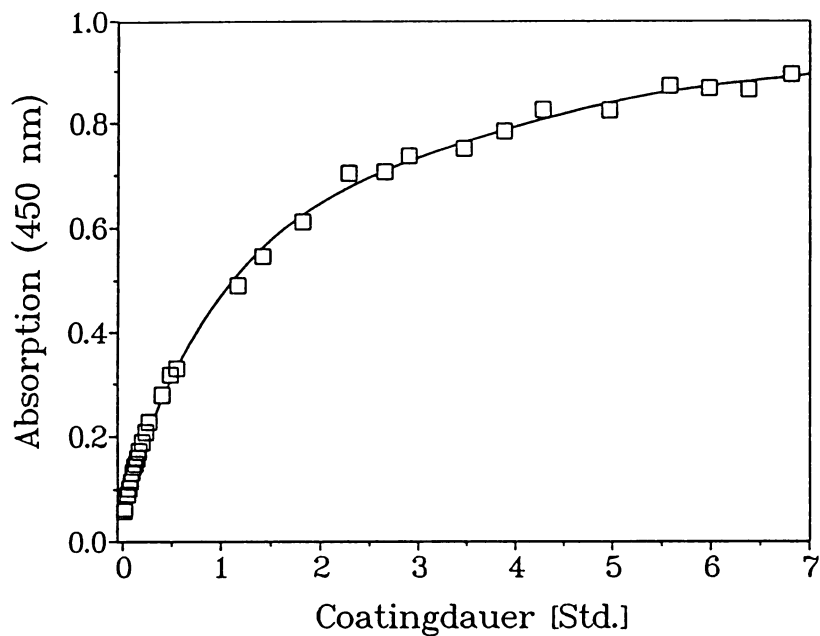


Abb. 52: Coating-Verlauf des polyklonalen Antikörpers C193. Antikörper: C193 1:20.000, 200  $\mu$ L, RT, Tracer: *i*-Pr/Cl/C6 1:20.000 (PBS + 0.5 g/L BSA), 200  $\mu$ L, 25 min, Entwicklung 5 min.

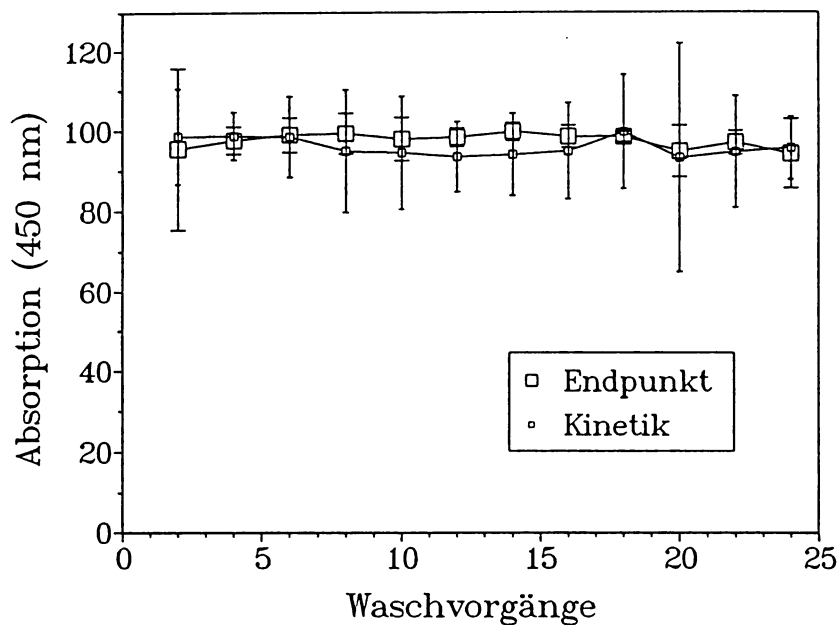


Abb. 53: Sorptionsstärke der immobilisierten Antikörper. Antikörper: K1F4 1:20.000, 48 h, RT, Reihen 2-24fach gewaschen, Tracer 1:10.000 (*t*-Bu/Et/C6), 200  $\mu$ L, 20 min, Entwicklung 10 min, Fehlerbalken: 2s.



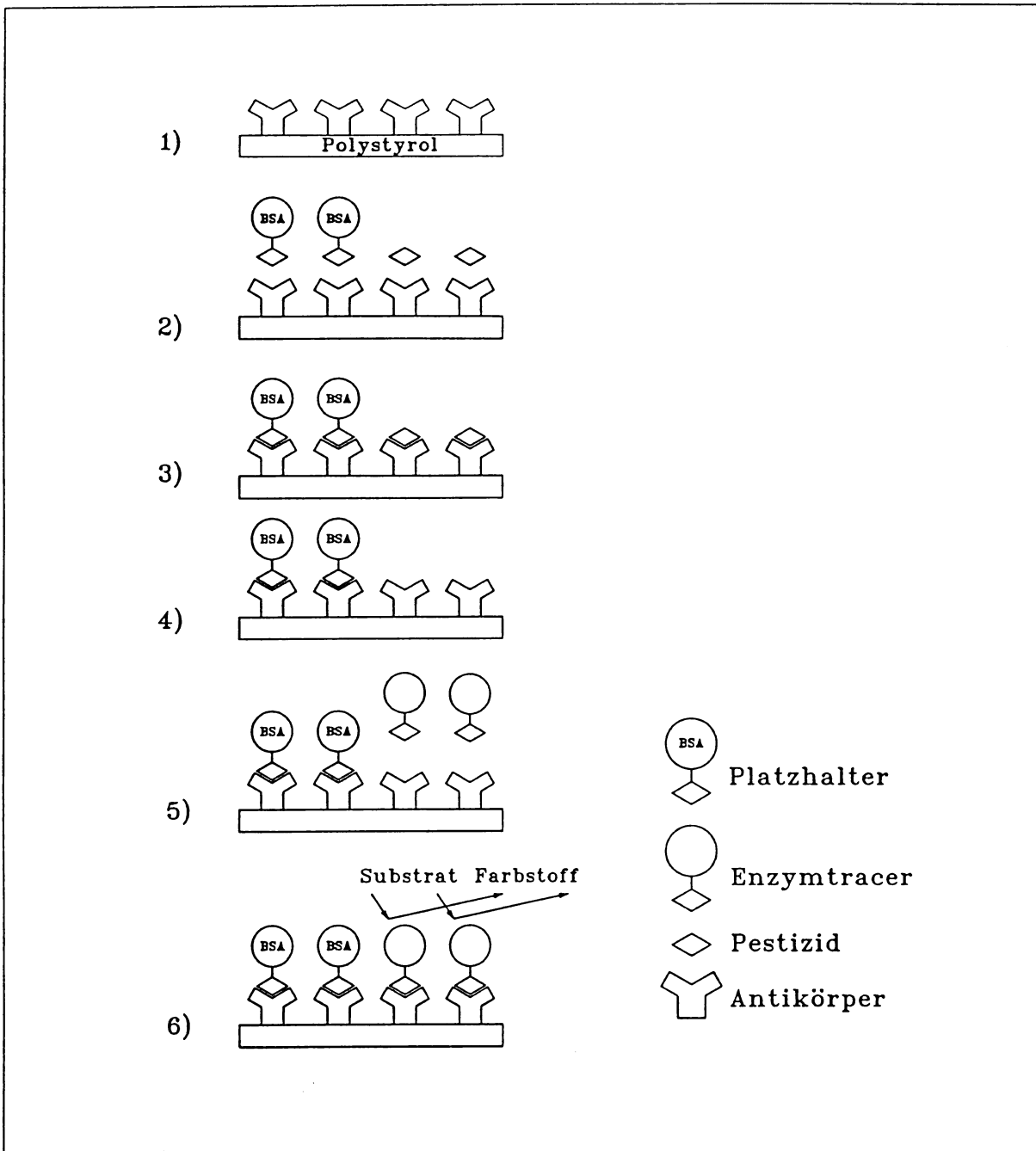
Im gleichen Experiment (Abb. 53) wurde auch die Endpunktmessung mit der kinetischen Enzymaktivitätsmessung verglichen. Obwohl für die kinetische Messung 10 Punkte in einer linearen Regression verarbeitet wurden, scheint die einfache Endpunktmessung zuverlässigere Werte zu liefern. Dies könnte man damit erklären, daß die kinetische Messung eine längere Zeit im Reader benötigt, in dem das Mischen (normalerweise im Rüttler) nicht optimal ist. So lange diese technischen Probleme nicht gelöst sind, kann man kinetische Messungen nur für Sonderfälle empfehlen.

### 1.9 Inverse Eichkurven

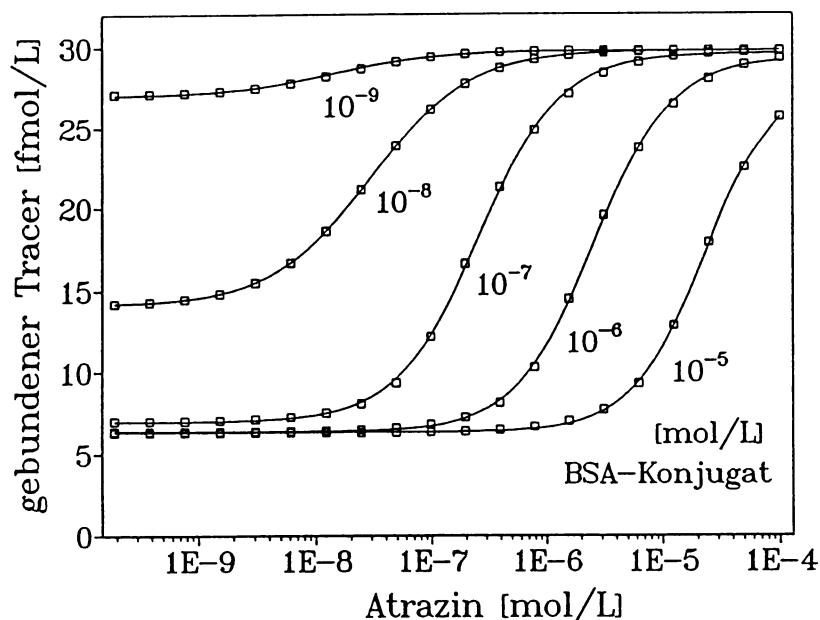
Ein Beispiel für die Nutzung von kinetischen Daten ist die Vorstellung einer neuen Testkonfiguration, die zu Eichkurven mit positiver Steigung führt. Kompetitive Immunoassays zeigen immer Eichkurven mit negativer Steigung, da der Tracer die nicht vom Analyt besetzten Bindungsstellen einnimmt. Bei der neuen Methode werden die sich um Größenordnungen unterscheidenden "Dissoziationskonstanten" von Tracer- und Analyt-Komplexen genutzt. Das Verfahren funktioniert analog zu einem Positiv/Negativ-Kopiervorgang in der Fotografie (Abb. 54).

Besonders interessant ist die Chronologie der Entwicklung dieser Testkonfiguration. Da durch andere Experimente schon recht früh der Verdacht aufgekommen war, daß Tracer und Analyt sehr unterschiedliche Dissoziationseigenschaften haben, wurde dieser Test-Typ am Computer simuliert. Die erhaltenen synthetischen Eichkurven (Abb. 55) bestätigten die theoretische Machbarkeit.

Es konnte durch die Simulation gezeigt werden, daß mit relativ hoher unspezifischer Bindung zu rechnen ist und daß die BSA-Konjugatkonzentration besonders kritisch für Empfindlichkeit bzw. Eichkurvenform ist.



**Abb. 54: Prinzip der inversen Eichkurven:** 1) Beschichten mit Antikörpern (Coaten), 2) Vorinkubation mit Analyt und Zusatz von Platzhaltern (BSA-Konjugat), 3) Ende der Inkubationszeit, 4) Starkes Waschen führt zur Dissoziation der Analytkomplexe, 5) Freie Stellen werden mit Enzymtracer aufgefüllt, 6) Waschen und Entwickeln.



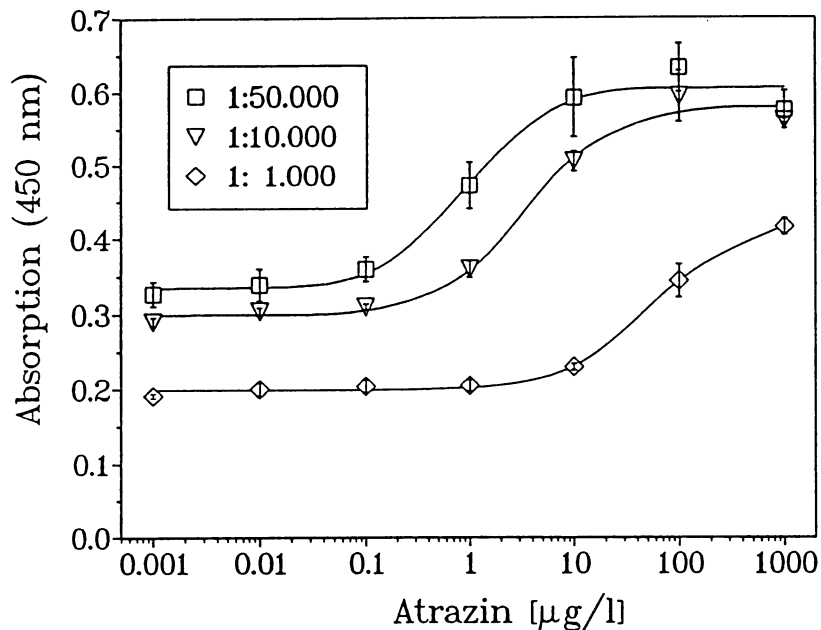
**Abb. 55:** Simulation von inversen Eichkurven. Gesamtdauer: 18 min, Zeitinkrement: 0.025 s,  $[Y]_0=10^{10}$  mol/L,  $[T]_0=10^7$  mol/L, Tracer:  $k_1=10^7$  L/mol·s,  $k_{-1}=10^2$  1/s, Analyt:  $k_2=10^7$  L/mol·s,  $k_{-2}=10^1$  1/s, BSA-Konjugat:  $k_3=10^6$  L/mol·s,  $k_{-3}=10^3$  1/s, Analytzugabe  $t=1$  min, BSA-Zugabe  $t=4$  min, Zwischenwaschen  $t=12$  min bis  $t=15$  min, Tracerzugabe  $t=15$  min, Waschen  $t=16$  min bis  $t=18$  min. Volumen: Analyt 200  $\mu$ L, BSA 100  $\mu$ L, Tracer 200  $\mu$ L.

Erst viel später wurde die experimentelle Realisierung versucht, die zu den Eichkurven in Abb. 56 geführt hat. Es ist sehr schön das analoge Verhalten in Simulation und Experiment zu sehen, obwohl die genauen kinetischen Konstanten nicht bekannt sind (bzw. waren). Dies demonstriert die Fähigkeit des Simulationssystems, das Verhalten eines Immunoassays auch unter vorher völlig unbekanntenen Meßbedingungen sinnvoll zu prognostizieren. Es ist also nicht unbedingt notwendig, neue Testkonfigurationen aufwendigst zu realisieren, um ihre Vor- und Nachteile studieren zu können. Erst wenn sich in der Simulation interessante bzw. nutzbare Eigenschaften zeigen, sollte die Realisierung vorangetrieben werden.

Inverse Eichkurven haben zwar einige Vorteile, wie leichte Interpretierbarkeit für Laien ("Viel Analyt ergibt viel Farbe"). Auch Enzymhemmungen kann man auf diese Weise aus dem Weg gehen. Trotzdem erscheinen diese Punkte teuer bezahlt: So sind hohe "unspezifische" Werte, Empfindlichkeitseinbußen und eine aufwendige Durchführung auf der Negativseite zu verbuchen. Hier sind erhebliche Verbesserungen notwendig, bis diese Testkonfiguration gegenüber den etablierten Typen konkurrenzfähig wird. Trotz der positiven Steigung unterliegt dieser Test den Restriktionen eines kompetitiven Tests, wie z.B. Affinitätslimitierung. Hier kommen noch Begrenzungen seitens der "kinetischen Selektivität" hinzu.

Gerade bei einem komplexen Testsystem erscheint es sinnvoll, wenn Optimierungsschritte am Computer durchgeführt werden. Die vorläufigen Ergebnisse einer Simulation (Daten nicht

dargestellt) zeigen, daß unter geeigneten Bedingungen zumindest ähnliche Sensitivitäten wie bei klassischen ELISAs erreichbar sein sollten. Möglicherweise könnte das Prinzip der inversen Eichkurven in modifizierter Form für Immunoassays im Teststäbchenformat eingesetzt werden.



**Abb. 56:** Inverse Eichkurven durch neue Testkonfiguration. Antikörper: AK C193 1:10.000, ca. 18 h, RT, Vorinkubation: 15 min, BSA-Konjugat (Platzhalter) *i-Pr/Cl/C6* (Verdünnungen siehe Grafik), 200 min, 6 Waschvorgänge, Tracer: *i-Pr/Cl/C6* 1:10.000, 20 min, 3 Waschvorgänge, Entwicklung 3 min.

Die Untersuchung des Konzentrationsverlaufs über die Zeit ist einer der größten Vorteile einer Simulation. Da es in ELISAs in absehbarer Zukunft nicht möglich sein wird, alle Konzentrationen parallel zu verfolgen, wird man auf Simulationen ausweichen müssen. Hier erkennt man den komplexen Verlauf eines ELISAs, der am Ende nur einen einzigen Meßwert liefert. Es ist einleuchtend, daß es ohne elektronische Hilfsmittel nur selten gelingen dürfte, durch reine Deduktion zu gültigen Schlüssen zu kommen. In Abb. 57 erkennt man die schnelle Gleichgewichtseinstellung nach der Zugabe des Analyten (ab 1 min). Durch das Hinzufügen des BSA-Konjugats tritt jedoch ein Verdünnungseffekt auf (Knick in der A- und Y-Kurve). Zudem wird Analyt langsam von den Bindungsstellen verdrängt (YA-Kurve). Das BSA-Konjugat bindet verhältnismäßig langsam (YS) bis zu einem Sättigungswert. Das Zwischenwaschen bringt drastische Veränderungen: Der Analyt-Komplex zerfällt rasch (YA), es werden Antikörperbindungsstellen frei (Y), der BSA-Komplex dagegen übersteht den Waschschrift fast unverändert (YS). Der anschließende Tracer-Sättigungsschritt wurde hier auf eine Minute beschränkt. Der Tracer-Komplex (YT) zerfällt beim letzten Waschschrift teilweise wieder. Hier ist ein Ansatzpunkt einer Optimierung zu erkennen: Man sollte einen stark bindenden Tracer verwenden, um ein maximales Signal zu erhalten.

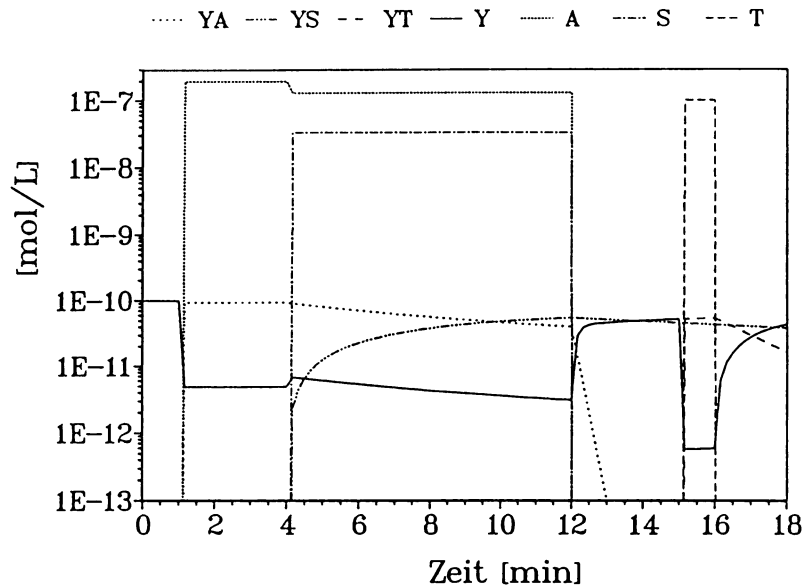


Abb. 57: Inverse Eichkurven, Konzentration-Zeit-Plot (Simulation). (Bedingungen siehe Abb. 55) BSA-Konjugat  $10^7$  mol/L, Atrazin  $2 \cdot 10^7$  mol/L. YA (Antikörper-Atrazin-Komplex) [mol/L], YS (Antikörper-BSA-Komplex) [mol/L], YT (Antikörper-Tracer-Komplex) [mol/L], Y (Antikörper bzw. Bindungsstellen) [mol/L], A (Atrazin bzw. Analyt) [mol/L], S (BSA-Konjugat) [mol/L], T (Enzymtracer) [mol/L].

### 1.10 Zwischenwaschen

Unter Zwischenwaschen ist ein Waschschrift zu verstehen, der zwischen der Inkubation der Probe und des Tracers angeordnet ist. Er wird aus unterschiedlichen Motivationen in Betracht gezogen. Die erste begründet sich auf der Möglichkeit, den direkten Kontakt zwischen Probe und Tracer zu vermeiden. Insbesondere Enzymhemmungen sollen unterdrückt werden [359].

Die zweite Motivation hängt mit dem Versuch zusammen, Immunosensoren zu bauen. So wird oft vorgeschlagen, Antikörper mit Tracer zu sättigen und dann die Verdrängung durch den Analyten zu messen. So verlockend und einleuchtend beide Ansätze auch klingen mögen, sie haben einen entscheidenden Nachteil: Sie liefern unter den hier diskutierten Randbedingungen keine brauchbaren Eichkurven. Zwar wurde in einer neueren Dissertation ein derartiger Verdrängungsimmunassay vorgestellt [121]. Die Probeninkubationszeit wurde zu zwei Stunden gewählt: Sicher kein attraktiver Wert für einen Sensor. Dies war notwendig, um genügend Antikörper-Komplexe des indirekten Testsystems dissoziieren zu lassen. Die Nachweisgrenze lag bei ca.  $1 \cdot 10^{-3}$  mmol/L bzw. 0.25 mg/L Biotin. Die Sensitivität konnte auch durch diverse Testvarianten und Verwendung neuer Fluoreszenzlabel nicht verbessert werden. Beachtet man die kinetischen Randbedingungen, so verwundert es nicht, daß ein analoges System mit einem höheraffinen Antikörper (T-2) nicht funktionierte. Nimmt man z.B. nur eine 10fach höhere Affinitätskonstante des T-2-Antikörpers relativ zum Biotin-

Antikörper an, so steigt die erforderliche Dissoziationsdauer auf 20 Stunden, um ein ähnliches Signal zu erhalten (Die Assoziationskonstante ist näherungsweise konstant). Man erkennt leicht, daß hier Geschwindigkeit und Sensitivität gegensätzliche Anforderungen stellen.

Das Problem für den Waschschrift zur Unterbindung von Enzymhemmungen (Analyt-Waschen-Tracer) ist die relativ hohe Dissoziationskonstante des Analyten. Es ist nur schwer möglich, einen Waschschrift und eine Tracerinkubation in z.B. weniger als 2 Minuten durchzuführen (Daten nicht dargestellt). Zudem leidet dieses Verfahren an verheerenden Empfindlichkeitseinbußen. Sollten tatsächlich Enzymhemmungen Probleme bereiten, so ist eine indirekte Konfiguration eines ELISA (siehe S. 8) oder ein inverser Test bei weitem vorzuziehen.

Die umgekehrte Variante (Tracer-Waschen-Analyt) krankt gleichfalls an kaum lösbaren Problemen. Abgesehen von der im allgemeinen langsamen Tracer-Dissoziation muß man sich klar machen, daß eine Konkurrenz bei kompetitiven Verfahren nur beim Assoziationsschrift auftritt. Die Dissoziation hängt nur von der Konzentration des Tracer-Antikörper-Komplexes ab - nicht aber von der Analytkonzentration. So wird zwar eine zeitliche Abhängigkeit des Signals gemessen, jedoch ohne jede Beteiligung des Analyten. Eine Konkurrenz findet also nicht statt. Eine Änderung dieser Lage tritt nur unter bestimmten Bedingungen auf. Wenn sich das System nach Stunden oder Tagen einem Gleichgewicht nähert, tritt durch die Assoziationskomponente langsam wieder eine Konkurrenz auf. Hierzu muß aber ein abgeschlossenes (kleines) Kompartiment vorliegen. In einer quasi-unendlichen Probe ("Sensor in den Fluß halten") tritt nie eine Rückreaktion und folglich auch keine Konkurrenz auf. Problematisch kann auch die effektiv vorhandene Tracermenge sein, denn normalerweise wird ein deutlicher Überschuß Tracer relativ zum Antikörper verwendet.

Der durch Sättigen der Antikörper gebundene Tracer muß später für einen vollständigen Test ausreichen. Dies kann nur bei extrem hohen Affinitätskonstanten gelingen, die wiederum einer schnelleren Einstellung des Gleichgewichts im Wege stehen. Andernfalls ist mit erheblichen Empfindlichkeitseinbußen zu rechnen, da die Voraussetzungen für einen kompetitiven Test (Antikörpermenge limitierend) nicht mehr gegeben sind. Es wurde ein entsprechendes Experiment auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt (Abb. 58). Zuerst wurde der Antikörper mit Tracer gesättigt und nach dem Zwischenwaschschrift wurden die Eichlösungen zugegeben. Um den Einwand zu entkräften, stark bindende Tracer könnten nicht vom Analyten verdrängt werden, wurden Tracer völlig unterschiedlicher (auch sehr schwacher) Affinitäten verwendet. Man erkennt unschwer, daß auch bei hohen Analytkonzentrationen nicht der geringste Anhaltspunkt für eine Verdrängung zu sehen ist.

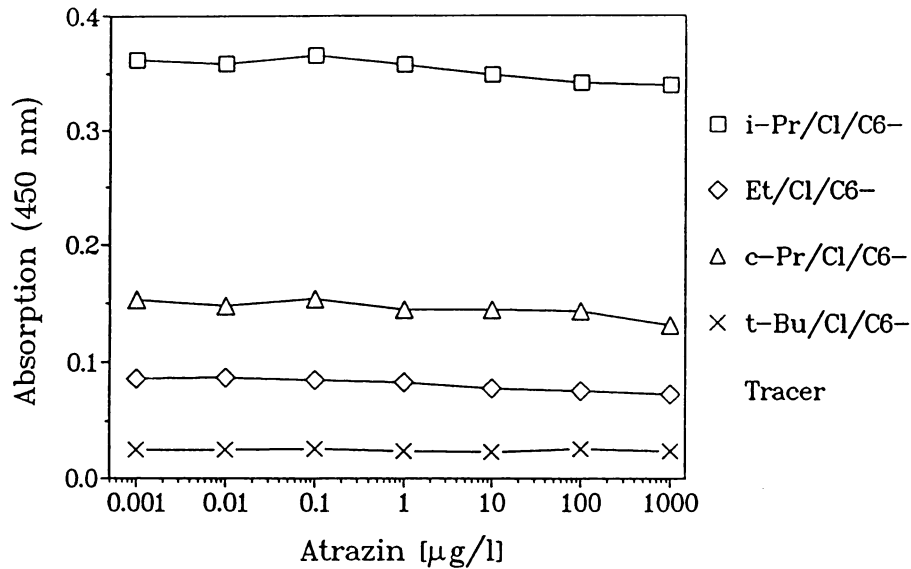


Abb. 58: Verdrängung des Tracers durch Analyt.

### 1.11 Schlußfolgerungen

Die kinetischen Konstanten von Hapten-Antikörper-Reaktionen lassen sich auch mit einfachen MTP-Techniken messen. Dabei ist die Dissoziationskonstante bei hochaffinen Antikörpern gut zugänglich, bei niedrigaffinen Antikörpern kann ein Maximalwert angegeben werden. Die Assoziationskonstanten sind schwer meßbar und werden am besten indirekt über die Gleichgewichtskonstante errechnet. Es wurde eine neue Methode zur Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten (Affinitätskonstanten) vorgestellt, die sich sehr vielseitig anwenden läßt, wenig aufwendig ist und in puncto Genauigkeit den "Referenzverfahren" vermutlich überlegen ist.

Die Kinetik des Tracers ist deutlich schwieriger zu messen und zu beschreiben. Bei der Dissoziation des Antikörper-Tracer-Komplexes wurden starke Abweichungen vom einfach exponentiellen Verhalten registriert. Die Bindung des Tracers an die Mikrotiterplatte wird in hohem Maße durch Adsorptionsvorgänge an der Mikrotiterplatte beeinflusst. Dies ist wahrscheinlich die Ursache für das partiell quasi-irreversible Bindungsverhalten des Tracers.

Die Messung von Konzentrationen der Immunoassay-Reaktanden ist nur partiell gelöst worden. Es ist sehr schwierig absolute Werte zu erhalten, die für die Berechnung von Assoziationskonstanten unbedingt erforderlich sind. Die Konzentration des Tracers kann verhältnismäßig genau bestimmt werden, wobei es sich jedoch gezeigt hat, daß die Konzentration des Enzyms nicht gut mit der Enzymaktivität korreliert. Für die Bestimmung von Antikörper-Konzentrationen wurden nur relative Sättigungsmethoden angewendet. Es wäre

denkbar, IgG-Immunoassays zur genaueren Quantifizierung zu verwenden und die quantitative Adsorption beim Coaten zu fördern.

Es konnte gezeigt werden, daß Antikörper an Polystyrol-MTP adsorptiv sehr fest gebunden werden und bei Einhaltung gewisser Regeln keine Probleme mit desorbierten Antikörpern auftreten.

Zudem wurde gefunden, daß die kinetische Messung der Enzymaktivität Nachteile bezüglich der Reproduzierbarkeit gegenüber der Endpunktmethode aufweist, die wahrscheinlich auf die mangelhafte Durchmischung der Substratlösung während der Messung im Reader zurückzuführen ist.

Trotz der Abweichungen des Tracerverhaltens scheinen etwas einfachere Modelle für die Beschreibung vieler Vorgänge in Immunoassays auszureichen. So konnte durch Computersimulationen ein neues Testdesign entworfen werden, das bei kompetitiven Immunoassays positive Eichkurvensteigungen liefert. Dieses Testdesign wurde realisiert und entspricht in seinem Verhalten der Prognose, die anhand von Computersimulationen gewonnen wurde.

Völlig im Einklang mit experimentellen Daten ist auch die Simulation von Zwischenwaschschritten, die als weitgehend kontraproduktiv erkannt wurden.

Allgemein kann festgehalten werden, daß die Messung von kinetischen Parametern in Kombination mit Computersimulationen sehr wertvolle Hinweise auf das Verhalten sowie auf Optimierungsmöglichkeiten und Störungsmechanismen von Immunoassays geben kann. Zusammenfassend werden in Tabelle 7 kinetische und thermodynamische Daten aus der Literatur und aus dieser Arbeit im Vergleich dargestellt.



Tabelle 7: Kinetische und thermodynamische Daten von Protein/Hapten-Reaktionen.

Analyt	Typ	K [L/mol]	$k_2$ [L/mol·s]	$k_{-2}$ [1/s]	Zitat
p-Nitrophenyl-Azofarbstoff	pAK	$5.8 \cdot 10^5$	$1.8 \cdot 10^8$	$7.6 \cdot 10^2$	[401]
2,4-Dinitrophenyl-Azofarbstoff	pAK	$5.7 \cdot 10^7$ ♦	$8 \cdot 10^7$	1.4	[402]
2,4-Dinitrophenyl-Azofarbstoff	pAK	$2.4 \cdot 10^5$	$1.7 \cdot 10^7$	70	[403]
2,4-DNP-Lysin	mAK	$1.8 \cdot 10^8$			[404]
2,4-DNP-Lysin	mAK	$4.1 \cdot 10^7$			[287]
Thyroxin (T4)	TBG			ca. $2 \cdot 10^{-4}$	[320]
Progesteron	PBG	$1.5 \cdot 10^9$	$8.8 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^{-2}$	[405]
Cortisol <sup>1</sup>	CBG	$7.9 \cdot 10^8$	$2.2 \cdot 10^6$	$2.8 \cdot 10^{-3}$	[405]
Progesteron <sup>1</sup>	COR	$1.5 \cdot 10^{10}$	$2.8 \cdot 10^5$	$1.9 \cdot 10^{-5}$	[405]
Dexamethason <sup>1</sup>	RLR	$7.3 \cdot 10^8$	$1.4 \cdot 10^4$	$2.0 \cdot 10^{-5}$	[405]
Biotin	AVI	$10^{15}$ *	$7.5 \cdot 10^7$ ♦	$7.5 \cdot 10^{-8}$	[406]
Biotin	SAVI	$10^{15}$ *	$2.4 \cdot 10^9$ ♦	$2.4 \cdot 10^{-6}$	[406]
O <sup>6</sup> -Ethyl-2'-desoxyguanosin	pAK	$1.5 \cdot 10^{10}$			[226]
Phosphocholin	Fab'	$1.6 \cdot 10^5$			[72]
2,4-D	pAK	$2.1 \cdot 10^8$			[274]
Digoxin	mAK	$3.0 \cdot 10^{11}$			[407]
Digoxin	pAK	$2.3 \cdot 10^{10}$	$1.7 \cdot 10^7$	$3.5 \cdot 10^{-4}$	[408]
Ouabain	pAK	$3.5 \cdot 10^9$	$8.7 \cdot 10^6$	$1.5 \cdot 10^{-3}$	[408]
Digitoxin	pAK	$6.1 \cdot 10^{10}$ ♦	$1.4 \cdot 10^7$	$2.3 \cdot 10^{-4}$	[408]
Fluorescein	mAK	$1.1 \cdot 10^7$	$9.2 \cdot 10^4$	$7.9 \cdot 10^{-3}$	[409]
Fluorescein <sup>2</sup>	pAK	$2.0 \cdot 10^9$	$5.2 \cdot 10^6$ ♦	$2.6 \cdot 10^{-3}$	[410]
Fluorescein	pAK	$6.1 \cdot 10^{10}$	$6.7 \cdot 10^7$	ca. $10^{-3}$	[214]
Atrazin (K1F4)	mAK	$4.1 \cdot 10^8$			<sup>3</sup>
Terbuthylazin (K1F4)	mAK	$2.0 \cdot 10^9$	$> 4 \cdot 10^7$ ♦	$> 2 \cdot 10^{-2}$	<sup>3</sup>
Atrazin (AK15)	pAK	$7.9 \cdot 10^7$			<sup>3</sup>
Atrazin (C193)	pAK	$1.4 \cdot 10^{10}$	$6.0 \cdot 10^7$ ♦	$4.3 \cdot 10^{-3}$	<sup>3</sup>
i-Pr/Cl/C6 (C193)	pAK	$1.3 \cdot 10^{11}$ #	$5.5 \cdot 10^7$ ♦	$4.2 \cdot 10^{-4}$	<sup>3</sup>

- ♦ Fehlende Werte berechnet.  
# Mittels Kreuzreaktionsdaten aus Atrazin-Wert berechnet.  
\* Zit. [411].  
1 Bei 0-4°C.  
2 Komponente I (Multicomponent Analysis).  
3 Diese Arbeit.

Betrachtet man die Gleichgewichtskonstanten der angegebenen Protein/Hapten-Komplexe, so fällt auf, daß die höchsten Werte bei Antikörpern bei knapp über  $10^{11}$  L/mol liegen. Der polyklonale Antikörper C193, der empirisch als anderen Triazinantikörpern überlegen eingestuft wird, zeigt auch bei der Gleichgewichtskonstante einen sehr hohen Wert. Für üblich hergestellte Antikörper kann diese Grenze offensichtlich nicht wesentlich übertroffen werden. Andererseits kann gefolgert werden, daß Antikörper mit deutlich niedrigeren Affinitätskonstanten als suboptimal gelten müssen. In diesen Fällen erscheint es prinzipiell möglich, durch verbesserte Immunisierungen Antikörper mit höheren Gleichgewichtskonstanten herzustellen.

Einen Sonderfall bildet offensichtlich das Biotin/Avidin-System. Hier sieht man sehr schön, daß hohe Affinitätskonstanten nicht durch eine Erhöhung der Assoziationskonstante, sondern durch eine Erniedrigung der Dissoziationskonstante erreicht werden. Das Biotin/Avidin-System zeigt auch, daß eine Gleichgewichtskonstante von  $10^{15}$  L/mol auch bei kleinen Molekülen theoretisch erreichbar ist.

Vergleicht man die in dieser Arbeit erhaltenen Werte mit anderen in der Literatur angegebenen Werten, so läßt sich feststellen, daß alle mit den vorgestellten Verfahren gemessenen Daten plausible Größenordnungen aufweisen. Besonders auffällig ist die gute Übereinstimmung der berechneten Assoziationskonstanten. Auch bei Triazin-Antikörpern wird die Affinitätskonstante in erster Linie von der Dissoziationskonstante des Analyt/Antikörper-Komplexes determiniert.

## **2 Strukturelle Aspekte**

### **2.1 Bridge Recognition**

Bridge Recognition (Bridge Binding, Spacer Recognition, Handle Recognition) wird sehr häufig für Mißerfolge im Immunoassay-Bereich verantwortlich gemacht [412]. Die bessere Erkennung des Tracers (incl. Spacer) habe zur Folge, daß der Analyt den Tracer nicht mehr von seinen Bindungsstellen verdrängen könne. Abgesehen davon, daß der Tracer bei den hier untersuchten ELISAs weitgehend irreversibel bindet und eine Verdrängung des Tracers nicht für das Funktionieren dieser Tests wichtig ist, erscheint die Hypothese der "Brückenantikörper" keineswegs zweifelsfrei belegt. Meines Erachtens konnte noch nie eine "Bridge Recognition" auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Dies hat umfangreiche Arbeiten angeregt, die hier vorgestellt werden sollen.

Auch oder besonders bei indirekten ELISAs werden Bridge Recognition-Effekte beobachtet. So sind viele Hapten-Immunoassays nur dann funktionsfähig, wenn mit einem heterologen Hapten gecoatet wird.

Ausgangspunkt waren die Eigenschaften des polyklonalen Atrazin-Antikörpers C193, der ausgezeichnete Empfindlichkeiten bei der Atrazinbestimmung zeigt (Nachweisgrenze ca. 2 ng/L). Hier wurde der umgekehrte Fall der üblichen Konstellation untersucht, es sollte geklärt werden, ob ein exzellenter Antikörper auch "Bridge Recognition" zeigt. Dies war insbesondere interessant, da dieser bisher unübertroffene Test eine homologe Konfiguration aufweist, d.h. der Tracer trägt das identische Hapten im Vergleich zum Immunogen.

Es wurden Struktur-Wirkungsbeziehungen untersucht, die auf Grundlage von Kreuzreaktionen (bzw. Testmittelpunkte C) bestimmter Derivate möglich sein sollten. Hierzu wurden ausgehend vom Immunogen (*i*-Pr/Cl/C6) Spacerderivate der Länge 1,3,4,5 und 6 (C-Atome) synthetisiert, die Derivate der Länge 0 und 2 sind leicht erhältlich, da sie Desethylatrazin bzw. Atrazin selbst verkörpern. In Abb. 59 sind die Strukturformeln dieser Derivate dargestellt.

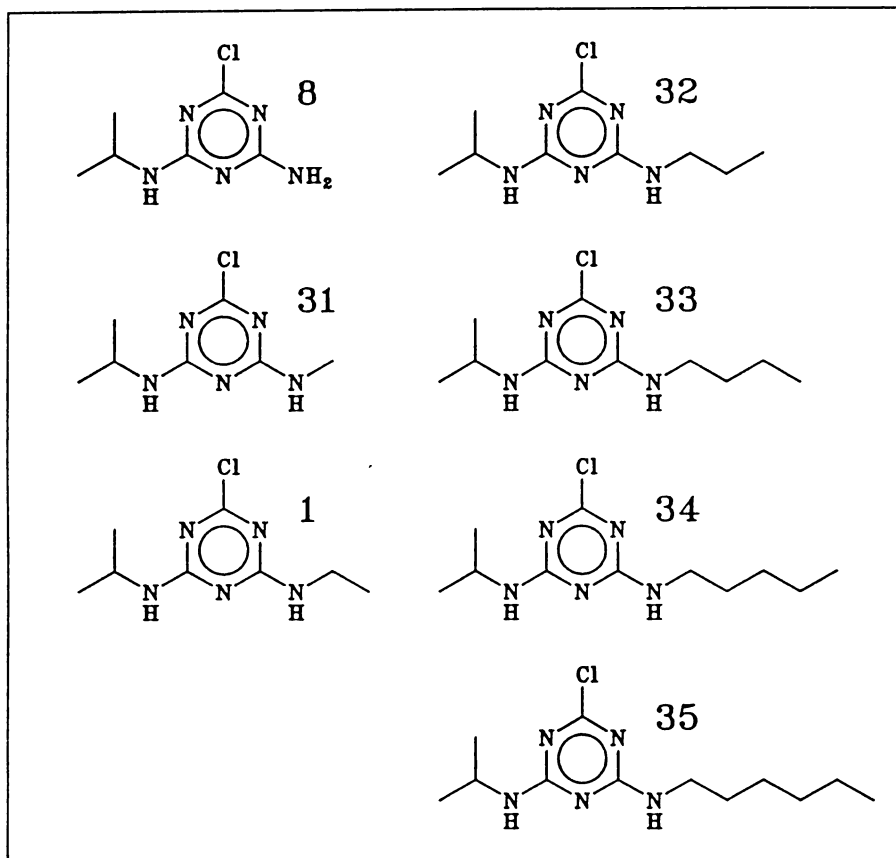


Abb. 59: Homologe Reihe von Atrazin-Derivaten (Alkylderivate). 8 *i*-Pr/Cl/H, 31 *i*-Pr/Cl/Me, 1 *i*-Pr/Cl/Et, 32 *i*-Pr/Cl/*n*-Pr, 33 *i*-Pr/Cl/*n*-Bu, 34 *i*-Pr/Cl/*n*-Pentyl, 35 *i*-Pr/Cl/*n*-Hexyl.

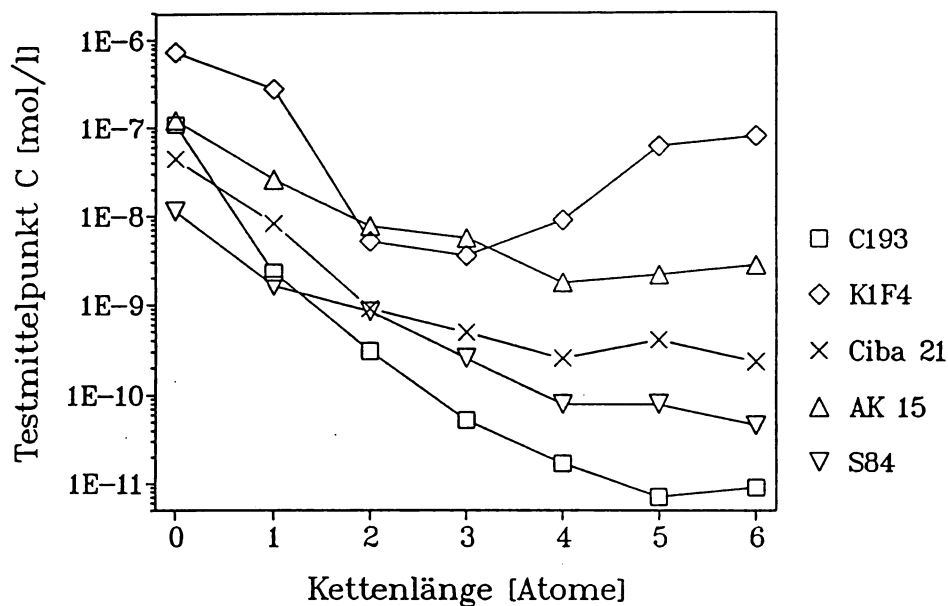
Es war nun zu erwarten, daß der Testmittelpunkt beim formalen Hinzufügen von jeweils einer CH<sub>2</sub>-Einheit so lange sinkt, bis der Spacer das Ende der Antikörperbindungsstelle erreicht. Dann sollte eine weitere Verlängerung keine weitere Veränderung verursachen. Es standen zu dem betreffenden Zeitpunkt fünf Triazin-Antikörper zur Verfügung. In Tabelle 8

sind kurz die wichtigsten Daten dieser Antikörper zusammengefaßt, da diese für die Interpretation von Belang sind.

**Tabelle 8: Antikörper für die Untersuchungen zur Spacer Recognition.**

Bezeichnung (siehe S. 247)	Typ	Kreuzreaktion(en) (primäre)	Hapten für Immunisierung	Tracer
C193	pAK	Propazin, Atrazin	i-Pr/Cl/C6	i-Pr/Cl/C6
K1F4	mAK	Terbuthylazin, Terbutryn, Prometryn	Ametrynsulfoxid	t-Bu/Et/C6
Ciba 21-1	mAK	Atrazin, Propazin, Prometon	i-Pr/Cl/C5	i-Pr/Cl/C6
AK 15	pAK	Propazin, Ametryn, Atrazin	Ametrynsulfoxid	i-Pr/Cl/C6
S84	pAK	Propazin, Atrazin, Desethylatrazin	i-Pr/Cl/C6	i-Pr/Cl/C6

pAK: polyklonaler Antikörper  
mAK: monoklonaler Antikörper



**Abb. 60: Testmittelpunkte der homologen Alkylderivat-Reihe.** 8 *i-Pr/Cl/H*, 31 *i-Pr/Cl/Me*, 1 *i-Pr/Cl/Et*, 32 *i-Pr/Cl/n-Pr*, 33 *i-Pr/Cl/n-Bu*, 34 *i-Pr/Cl/n-Pentyl*, 35 *i-Pr/Cl/n-Hexyl*. Antikörper: 1:20.000, ca. 18 h, RT, 200  $\mu$ L, Vorinkubation: 90 min, 200  $\mu$ L, RT, Tracerinkubation: 10 min, 1:10.000, Entwicklung: 5-40 min.

Verfolgt man die Kurve des Antikörpers C193 (Abb. 60), so erkennt man eine starke Erniedrigung des Testmittelpunkts bis zum C<sub>5</sub>-Derivat. Dies kann man als Bridge Recognition interpretieren. Die Änderung der Affinität reicht ca. bis zum 5. Kohlenstoffatom des

Spacers und macht insgesamt einen Faktor von über 15.000 ( $C_0/C_5$ ) aus. Auch der Unterschied zwischen Atrazin ( $C_2$ ) und dem Pentylderivat beträgt immer noch mehr als den Faktor 40. Auf "Pentyl-Atrazin" (Abb. 59: 34) bezogen hat Atrazin nur noch eine Kreuzreaktion von mäßigen 2.3 %. Hier wird auch klar, daß auch scheinbar hochselektive Antikörper, bestimmte Spezialverbindungen noch um Größenordnungen besser detektieren können (siehe S. 72). Aus der räumlichen Grenze kann auch die Bindungsstelle des Antikörpers in ihrer Ausdehnung abgeschätzt werden. Diese Interpretation wird gestützt durch die Vermessung der  $C_6$ -Derivate (Abb. 61), abgeleitet von der Carbonsäure 14 (Abb. 18). Die Verlängerung des Spacers von 6 auf 13 Atome bewirkt keine signifikante Veränderung mehr. Ein ähnliches Verhalten erhält man bei der Verwendung von Carbonsäuren unterschiedlicher Länge (Daten nicht dargestellt).

Ein analoge Kurven werden auch bei den "verwandten" Antikörpern S84 und Ciba 21-1 erhalten (Abb. 60). Besonders interessant ist der monoklonale Antikörper Ciba 21-1, der im Gegensatz zu C193 und S84 mit einem  $C_5$ -Spacer immunisiert wurde. Hier ist der "Knick" in der Kurve schon bei kürzeren Spacerderivaten (relativ zu C193) zu erkennen. Der Ametrynsulfoxid-Antikörper AK 15 zeigt ein unausgeprägtes Verhalten auf hohem Testmittelpunktsniveau. Diese geringe Differenzierung spricht für eine geringe Spezifität. Ein ungewöhnliches Verhalten zeigt der monoklonale Antikörper K1F4. Da er mit einem Ametrynsulfoxidderivat (ohne Spacer) gewonnen wurde, das mit den angebotenen Homologen nur entfernt verwandt ist, findet man ein ausgeprägtes Minimum des Testmittelpunkts. Dieses liegt bei  $C_2$  und  $C_3$ . Die  $C_2$ -Verbindung (Atrazin) ist das einzige Derivat, das eine Analogie zu Ametrynsulfoxid aufweist. Die hohe Kreuzreaktion des  $C_3$ -Derivats weist auf eine Unvollkommenheit der Bindungsstelle hin, die die Aufnahme einer weiteren  $CH_2$ -Gruppe begünstigt. Dies ist auch eine Analogie zur hohen Kreuzreaktion von Terbutylazin, das auch etwas größer als Atrazin ist. Erst wenn versucht wird, eine noch größere Alkylgruppe unterzubringen, steigt der Testmittelpunkt wieder an.

Bei allen untersuchten Antikörpern gibt es keine signifikante Reaktion über  $C_6$  hinaus. Dies kann unterschiedliche Gründe haben: So wäre es möglich, daß Antikörperbindungsstellen räumlich immer so konstruiert sind, daß keine längeren Spacer erkannt werden können. Eine andere Möglichkeit besteht in den beschränkten Strukturen der bisher verwendeten immunogenen Haptene. Es ist eigentlich nicht zu erwarten, daß eine Bridge Recognition weit über die maximale Länge der bisher verwendeten Spacer hinaus auftritt. Erst die Immunisierung mit längeren Derivaten könnte diese Frage klären.

Doch nun stellt sich die Frage, ob vielleicht die hohe Empfindlichkeit des Antikörpers C193 im positiven Sinne etwas mit Bridge Recognition zu tun haben könnte. Man kann also die Antithese zur bisherigen Anschauung formulieren, die von der Annahme ausging, Bridge Recognition hätte eine Verschlechterung des Testmittelpunkts zur Folge.

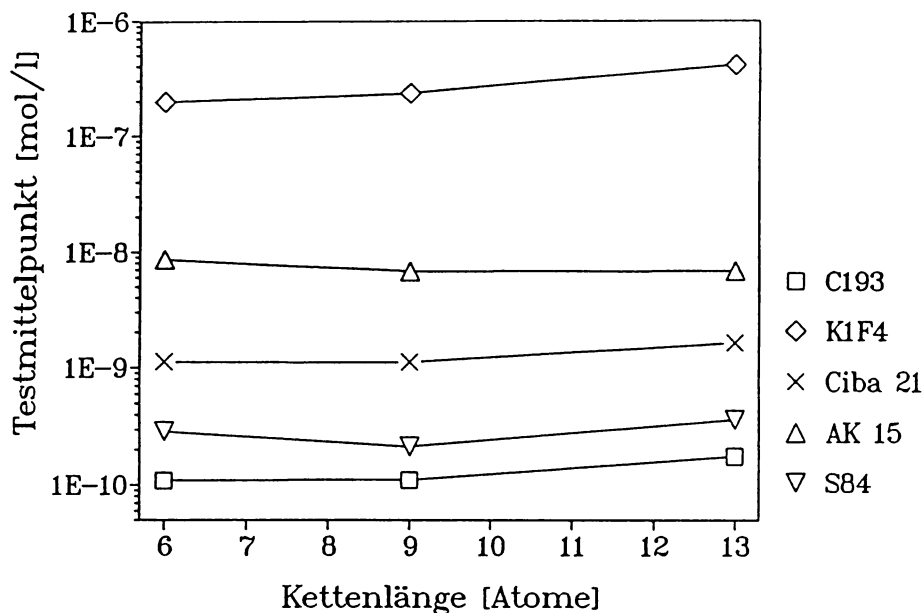


Abb. 61: Testmittelpunkte der verlängerten  $C_6$ -Carbonsäurederivate. 14 *i*-Pr/Cl/C6, 17 *i*-Pr/Cl/C6-C2, 18 *i*-Pr/Cl/C6-C6. (Bedingungen analog zu Abb. 60)

Primär wurde es notwendig, eine klare Definition für Bridge Recognition zu finden. Die übliche Angewohnheit, von Brückenantikörpern zu reden, aber nicht zu definieren, wie man sie quantitativ charakterisieren könnte, sollte nicht mehr weitergeführt werden. Die Überlegung ging von der Affinität des Analyten aus, die sinnvollerweise zur Normierung dienen sollte. Daraus ergibt sich recht zwanglos eine sehr allgemein anwendbare Definition. Man mißt die Kreuzreaktion eines Derivats, das ein(e) Atom(gruppe) mehr besitzt, als der Analyt. Die Atomgruppe entspricht genau der nächsten zusammenhängenden Einheit des Spacers. In einer Alkylkette entspricht diese Einheit einer  $CH_2$ -Gruppe. In unserem speziellen Fall würde man für das Atrazin (*i*-Pr/Cl/Et), das um einen Kohlenstoff verlängerte Derivat, das *n*-Propyl-Atrazin (*i*-Pr/Cl/*n*-Pr) verwenden. Dies gilt genaugenommen natürlich nur für Immunogene, die den Alkylspacer als Verlängerung der Ethylgruppe des Atrazins tragen. Man berechnet nun die molare Kreuzreaktion dieses Analyt+ $C_1$ -Derivates bezogen auf den Analyten. Dieses Prinzip läßt sich sinngemäß auf fast alle Hapten-Strukturen übertragen. Man kann diese Kreuzreaktion direkt als "Bridge Recognition" definieren. Es ist jedoch zu beachten, daß eine Substanz ohne "Bridge Recognition" mit dem Wert 100 % korrespondiert. 200% Bridge Recognition würde dann eine Verdopplung der Kreuzreaktion bedeuten. Werte unter 100 % bedeuten eine schlechtere Bindung im Verhältnis zum Analyt.

Diese Definition der Bridge Recognition lautet also:

$$BrRec = \left[ \frac{C_{Analyt}}{C_{Spacerderivat}} \right] \times 100 \% \quad (Gl. 50)$$

mit: **BrRec** Bridge Recognition [%]  
**C<sub>Analyt</sub>** Molarer Testmittelpunkt des Analyten [mol/L]  
**C<sub>Spacerderivat</sub>** Molarer Testmittelpunkt des Analyt+C<sub>1</sub>-Derivats\* [mol/L]  
 \* C<sub>1</sub> kann auch eine Nichtkohlenstoff-Gruppe sein.

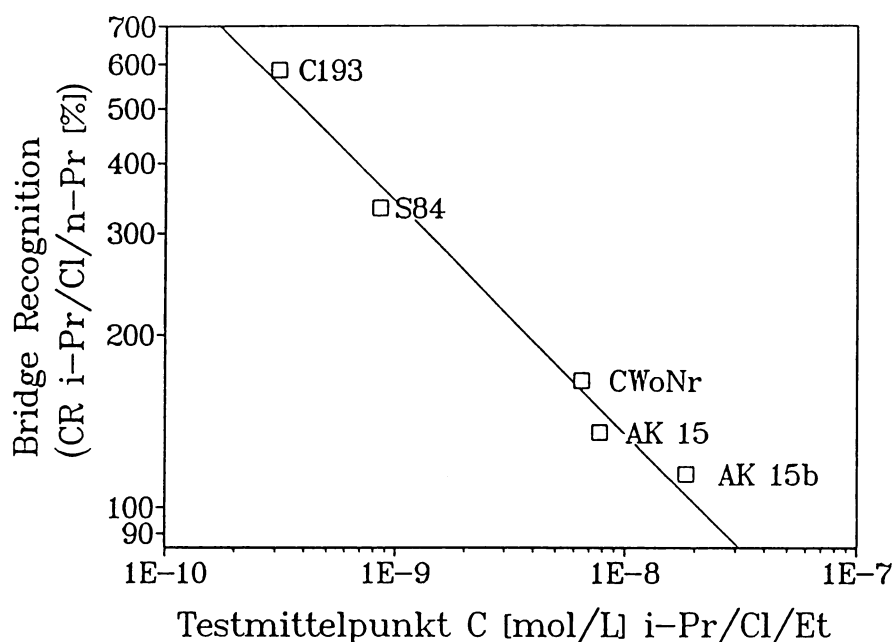
Tabelle 9: Weitere Antikörper für die Spacer-Recognition-Untersuchungen.

Bezeichnung (siehe S. 247)	Typ	Kreuzreaktion(en) (primäre)	Hapten für Immunsierung	Tracer
NMI 118	mAK	Propazin, Terbutylazin, Atrazin	"MIX10" <sup>1</sup>	i-Pr/Cl/C6
NMI 54	mAK	Propazin, Terbutylazin, Atrazin	"MIX10" <sup>1</sup>	i-Pr/Cl/C6
K1A11	mAK	Prometryn, Ametryn, Atrazin, Terbutryn	Ametrynsulfoxid	i-Pr/Cl/C6
K6E5	mAK	-	i-Pr/Cl/Cl	i-Pr/Cl/C6
P6A7	mAK	Terbutylazin	i-Pr/Cl/Cl	i-Pr/Cl/C6
K4E7	mAK	-	Et/Cl/C6	i-Pr/Cl/C6
CWoNr	mAK	-	i-Pr/Cl/C6	i-Pr/Cl/C6

<sup>1</sup> Mischung aus 10 Triazinderivaten, siehe Experimenteller Teil (S. 270).

- Kreuzreaktionen nicht bekannt.

Von den oben genannten und von einigen später hinzugenommenen Antikörpern (Tabelle 9) wurde die Bridge Recognition nach Gleichung 50 berechnet und gegen den Testmittelpunkt von Atrazin aufgetragen. Die polyklonalen und die monoklonalen Antikörper wurden getrennt aufgeführt. Die polyklonalen Antikörper scheinen eine deutliche Korrelation zwischen Testmittelpunkt (Atrazin) und Bridge Recognition aufzuweisen (Abb. 62). Ob man die Datenbasis für das Gegebensein eines linearen Zusammenhangs für ausreichend hält oder nicht: Zumindest ist zu erkennen, daß unempfindliche Antikörper eine geringe Bridge Recognition haben (können) und daß empfindliche Antikörper extrem hohe Bridge Recognition aufweisen (können). Dies stellt die weitverbreitete Ansicht, Bridge Recognition führe zu unempfindlichen Tests, stark in Frage. Es muß unbedingt geklärt werden, ob eine verstärkte Bridge Recognition zu besseren Antikörpern führt.



**Abb. 62:** Korrelation zwischen Bridge Recognition und Empfindlichkeit. Analyt: *i-Pr/Cl/Et* (Atrazin), Analyt +  $C_7$ -Derivat: *i-Pr/Cl/n-Pr* ("n-Propylatrazin") C193, S84 und CWoNr: *i-Pr/Cl/C6*-Immunogen, AK 15: Ametrynsulfoxid, alle polyklonal.

Undurchsichtiger ist die Lage bei monoklonalen Antikörpern. Besonders problematisch ist die Tatsache, daß keine mAKs zur Verfügung standen, die genau mit dem passenden Immunogen (*i-Pr/Cl/C6*) hergestellt worden wären. Es läßt sich zwar ein den polyklonalen Antikörpern ähnlicher Trend ahnen, eine strenge Korrelation ließ sich aber nicht nachweisen (Abb. 63). Auch hier kann man zumindest festhalten, daß hohe Spacer Recognition keinen negativen Einfluß auf die Empfindlichkeit hat. Es gibt keine Anhaltspunkte, die eine gegenteilige Hypothese stützen würden.

Es muß jedoch diskutiert werden, wieso der Zusammenhang bei polyklonalen und monoklonalen Antikörpern so unterschiedlich auszusehen scheint. Eine mögliche Ursache kann die Screening-Prozedur sein, die bestimmte Eigenschaften diskriminiert und daher zu einer Verzerrung der "Antikörper-Verteilung" führt. So wurde von GIERSCHE und HOCK [201] berichtet, daß bei ihrem Screening "Brücken-Antikörper" verworfen würden.

Möglich ist auch ein struktureller Unterschied zwischen (monoklonalen) Maus-Antikörpern und (polyklonalen) Kaninchen- oder Ziegen-Antikörpern. Es ist durchaus denkbar, daß bei vielen Mäuse-Stämmen immunologische "Blinde Flecke" existieren, die die Produktion bestimmter Antikörper-Strukturen durch das eingeschränkte Repertoire verhindern.



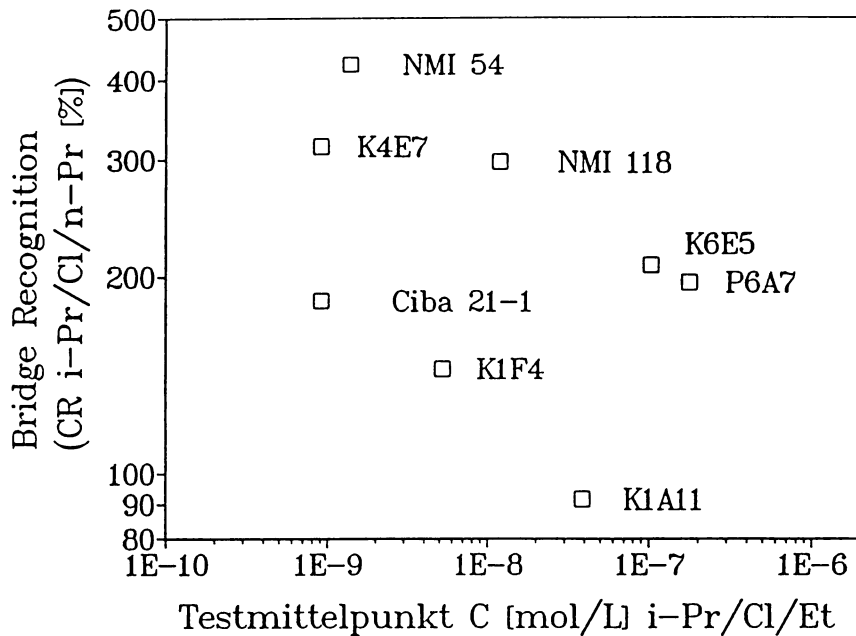


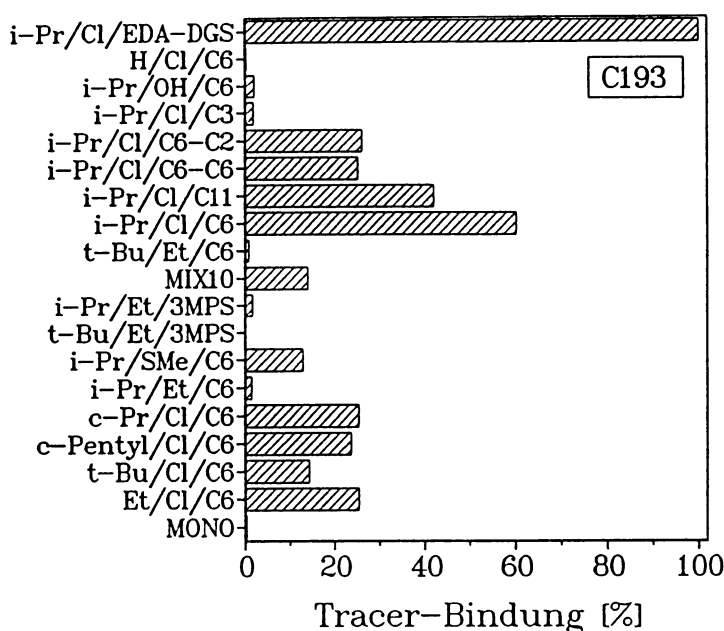
Abb. 63: Korrelation zwischen Bridge Recognition und Empfindlichkeit. Immunogene siehe Tabelle 9, alle monoklonal.

## 2.2 Affinität des Tracers

Da die Wechselwirkung des Tracers mit den Antikörpern und der Mikrotiterplatte ziemlich komplexe Abhängigkeiten zeigt (siehe S. 99 ff.), ist es im Gegensatz zu den Analyten schwierig, an thermodynamische oder kinetische Daten zu kommen. Dies kann umgangen werden, indem nicht die Tracer selbst, sondern ihre Haptene einer Untersuchung unterzogen werden. Daß dies zu sinnvollen Ergebnissen führt, konnte in Vorarbeiten [302] gezeigt werden. So lieferten Haptene mit hoher Kreuzreaktion (hoher Affinitätskonstante) nützliche Tracer. Zwar können Untersuchungen an isolierten Haptenen die Suche nach geeigneten Strukturen sehr vereinfachen, bestimmte Faktoren können jedoch nicht prognostiziert werden. Sterische Probleme sind bei Tracern häufig [267] und treten oft erst nach der Kopplung des Haptens an das Enzym auf.

Aus diesem Grund wurde versucht, ein Verfahren zu entwickeln, das den einfachen und schnellen Vergleich unterschiedlicher Tracer erlaubt ("Ranking"). Der wichtigste Punkt ist die Messung der Enzymaktivität des Tracers. Dies kann nach einer beliebigen Methode erfolgen, hier wurde das chromogene Substrat Tetramethylbenzidin verwendet. Dann werden die Tracer auf eine Standardkonzentration gebracht, die in einem für den ELISA günstigen Bereich liegen sollte (hier:  $10^{-9}$  mol/L). Der Tracer wird in einer stabilisierenden Lösung (PBS mit BSA und Häm [413]) angesetzt. Da es schwierig ist, diese Konzentrationseinstellung mit der notwendigen Genauigkeit durchzuführen, sollte sich eine Bestimmung der Enzymaktivität der verdünnten Lösungen anschließen. Die später mit Antikörpern erhaltenen

Bindungswerte werden dann auf diese Enzymaktivität normiert. Die Tracerlösungen können einige Zeit im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die antikörperbeschichtete Mikrotiterplatte wird mit PBS vorinkubiert, um ein Austrocknen zu vermeiden und mit den Tracerlösungen versetzt. Nach einer festen Inkubationszeit wird gewaschen und entwickelt. Da auf den höchsten auftretenden Median normiert wird, ist eine einheitliche Entwicklungszeit bzw. Antikörperkonzentration nicht erforderlich. Wenn eine größere Anzahl unterschiedlicher Tracer zur Verfügung steht, sind auch wertvolle Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erhalten.



**Abb. 64:** Tracerbindung an pAK C193. Immunogen: *i-Pr/Cl/C6*, Antikörper C193 1:20.000, Entwicklung 20 min. (Erklärung der Tracer-Kurzbezeichnungen siehe S. 275)

In Abb. 64 ist das Tracer-Pattern des polyklonalen Atrazin-Antikörpers C193 (Kaninchen) dargestellt. Auffällig ist die extrem starke Bindung des längsten Spacer-Derivats *i-Pr/Cl/EDA-DGS*. Es übertrifft sogar noch das homologe Hapten *i-Pr/Cl/C6*. Auch der C11-Spacer scheint günstig zu sein. Interessant ist, daß auch deutlich vom Immunogen abweichende Strukturen erkannt werden, z.B. wirkt die Cyclopentylamin-Gruppe (statt *i-Pr*) und die Thiomethyl-Gruppe (statt *Cl*) nicht prohibitiv. Auch das Ethylderivat wird noch gut erkannt. Dies kann natürlich an anderen im Serum vorhandenen Fraktionen liegen, die im üblichen ELISA nicht aktiviert werden. Die Variation der Spacer-Anbindungsstelle dagegen wirkt sich stark negativ aus. Alle Derivate mit derartigen Strukturen werden kaum gebunden. Auch Hydroxy- und Desalkyl-Derivate werden nicht erkannt. Die Verkürzung des Spacers von  $C_6$  auf  $C_3$  führt zu einer Verminderung des Signals auf nur noch 2 Prozent.

In Abb. 65 ist das Verhalten des polyklonalen Atrazin-Antikörpers S84 (Schaf) aufgetragen. Allgemein ist das Muster sehr ähnlich zu C193, was aufgrund des identischen Immunogens auch nicht verwundert. Der Antikörper S84 scheint im Bezug auf die Variation der Alkylreste

noch selektiver als C193 zu sein. Ethyl- und Cyclopropyl-Derivate werden kaum noch gebunden. Die Verkürzung des Spacers von C<sub>6</sub> auf C<sub>3</sub> wirkt stark negativ. Hier sinkt das Signal gleichfalls auf 2 Prozent ab.

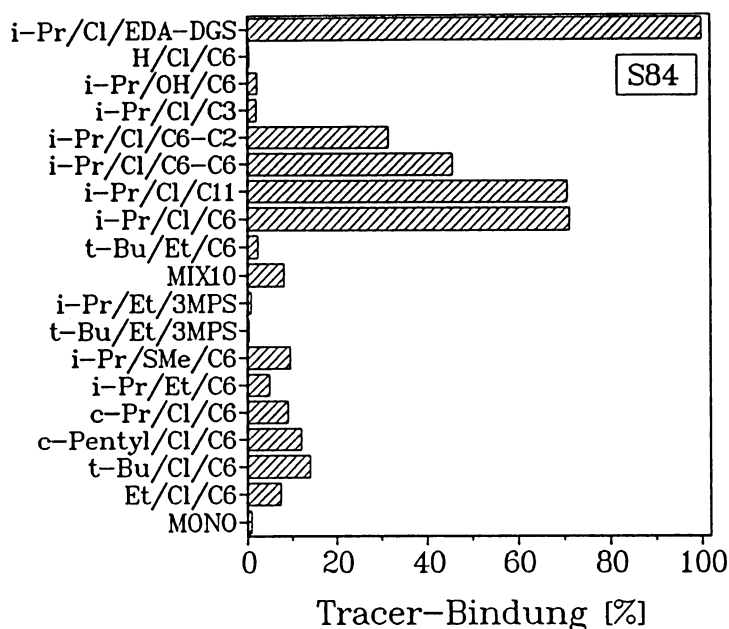


Abb. 65: Tracerbindung an pAK S84. Immunogen: *i-Pr/Cl/C6*, Antikörper S84 1:20.000, Entwicklung 30 min.

In Abb. 66 sind die Ergebnisse des polyklonalen Antikörpers CWoNr dargestellt. Die Ähnlichkeit zu den vorhergehenden Antikörpern C193 und S84 erstaunlich. Dies läßt sich auch in diesem Fall auf identische Immunogene zurückführen. Im Gegensatz zu S84 ist CWoNr im Bezug auf Alkylreste sehr anspruchslos. Das Cyclopentyl-Derivat ist sogar eines der am besten bindenden. Ein sehr interessantes Detail ist das hohe Signal bei *i-Pr/Et/C6*. Dies widerspricht dem üblichen Verhalten, daß veränderte Spaceranbindung zu stark reduzierten Affinitäten führen. Da das Derivat fest gekoppelt an der Peroxidase präsentiert wird, könnte man daraus schließen, daß die Bindungsstelle des Chlors so undifferenziert ausgebildet ist, daß auch eine Ethylamino-Gruppe hineinpaßt. Das analoge *t*-Butyl-Derivat wird dagegen fast nicht gebunden.

Völlig anders präsentiert sich der polyklonale Antikörper AK 15 (Abb. 67). Bei Ametryn-sulfoxid-Konjugaten ist das eigentliche Immunogen nicht bekannt. Es könnte sich um ein Schwefel-Derivat (Cystein) und/oder ein Amin (Lysin) handeln. Das hohe Signal von *i-Pr/Et/C6* gegenüber *i-Pr/Et/3MPS* spricht für die Anwesenheit von Aminderivaten im Immunogen. Da in den meisten Proteinen keine freien Sulfhydryl-Gruppen vorkommen, entspricht das Ergebnis der Erwartung. Allgemein ist das Bindungsmuster relativ unspezifisch. Dies zeigt sich auch an den hohen Bindungswerten der *i-Pr/Cl/C6*-Familie. Die Ähnlichkeit zwischen diesen Derivaten und dem Immunogen ist eher mäßig. Hier ist der

umgekehrte Fall im Vergleich zu CWoNr zu sehen, ein Chloratom scheint die Bindungsstelle des Ethylamin-Rests einnehmen zu können. Dies spricht für die Hypothese, daß diese Bindungstaschen weitgehend auf hydrophoben Wechselwirkungen basieren.

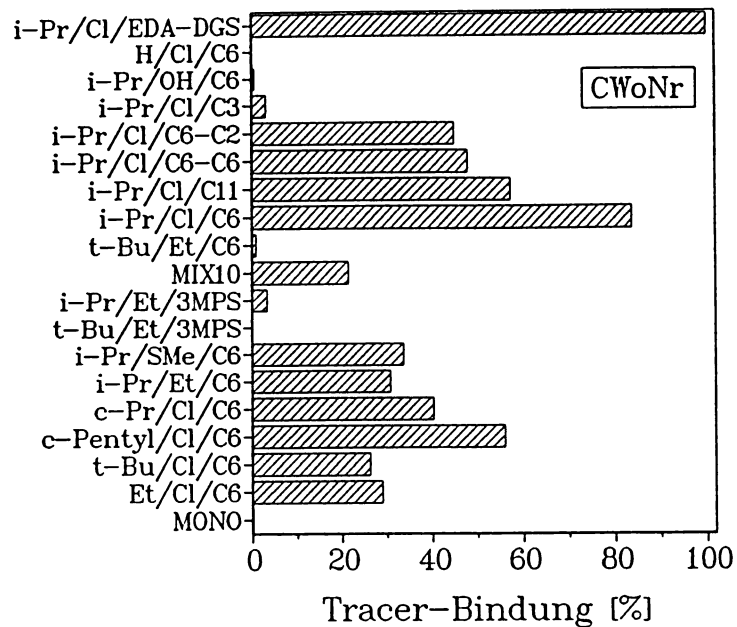


Abb. 66: Tracerbindung an pAK CWoNr. Immunogen: i-Pr/Cl/C6, Antikörper CWoNr 1:5.000, Entwicklung 30 min.

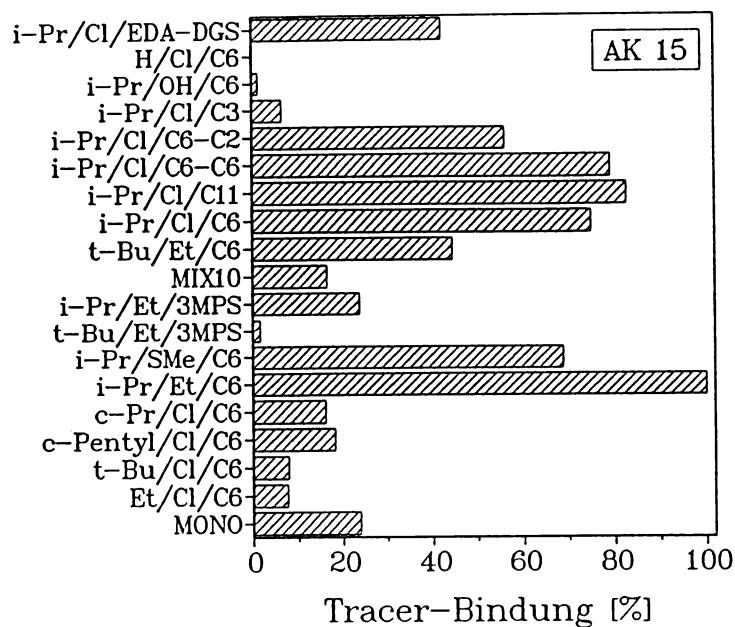


Abb. 67: Tracerbindung an pAK AK 15. Immunogen: Ametrynsulfoxid, Antikörper AK 15 1:20.000, Entwicklung 10 min.

In die gleiche Gruppe wie AK 15 gehört auch der polyklonale Antikörper AK 19 (Abb. 68). Die Muster sind grob ähnlich, aber in diesem Fall besser differenziert. *i*-Pr/Cl/C6 wird optimal gebunden, trotz der begrenzten Ähnlichkeit zum Immunogen. Es könnte sich um eine Erkennung eines Teils des Lysin-Rests handeln, der eine große Ähnlichkeit zur 6-Aminohexansäure (C6) hat. Hier tritt der gleiche Effekt wie bei AK 15 auf: Bei einer Verlängerung des Spacers sinkt die Affinität deutlich ab. Das bedeutet, daß nur Antikörper, die mit Spacer-Immunogenen gewonnen wurden, lange Spacer effektiv nutzen können.

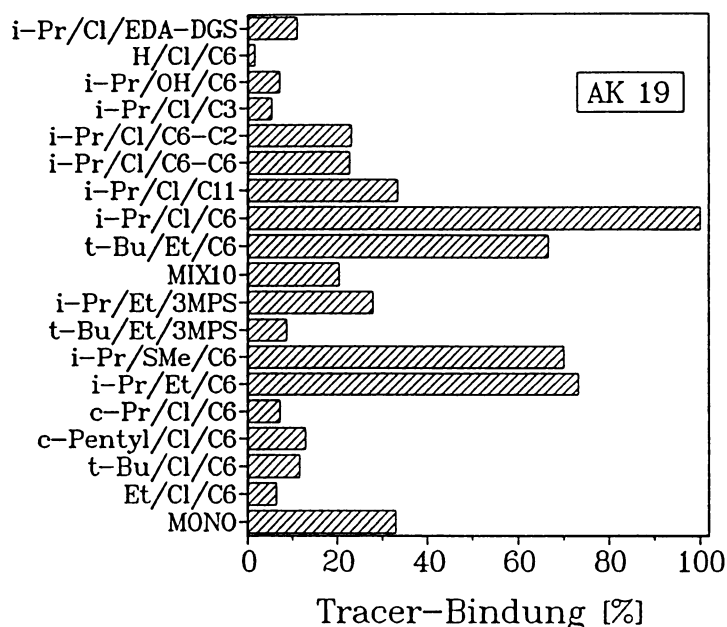


Abb. 68: Tracerbindung an pAK AK 19. Immunogen: Ametrynsulfoxid, Antikörper AK 19 1:5.000, Entwicklung 60 min.

Einen Einzelfall in dieser Reihe bildet der Desalkyl-Atrazin-Antikörper C10 (polyklonal). In Abb. 68, Abb. 69 ist das sehr ausgeprägte Muster zu erkennen. Interessanterweise bindet nebst homologem Tracer auch der *i*-Pr/Cl/C11- und der *i*-Pr/C6/C6-C6-Tracer (MIX10 muß binden, da er H/Cl/C6 enthält). Dies könnte man sich mit einer Bridge Recognition erklären, da ein variiertes Spacer (*i*-Pr/Cl/EDA-DGS) kein nennenswertes Signal ergibt. In diesem Fall fehlen wichtige Derivate, so die Desalkylderivate mit verändertem Spacer oder ersetzttem Chlor. Man darf sich daher nicht der Illusion hingeben, dieser Antikörper sei viel selektiver als die vorher gezeigten.

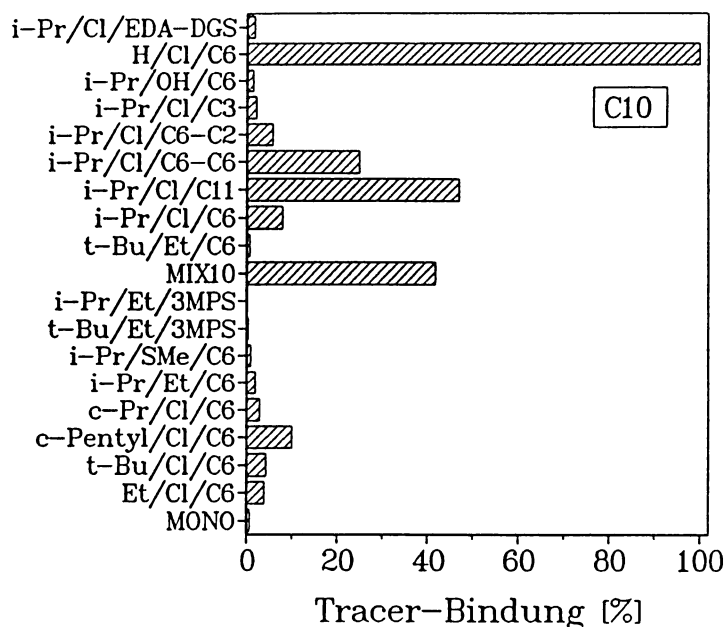


Abb. 69: Tracerbindung an pAK C10. Immunogen: H/Cl/C6, Antikörper C10 1:20.000, Entwicklung 30 min.

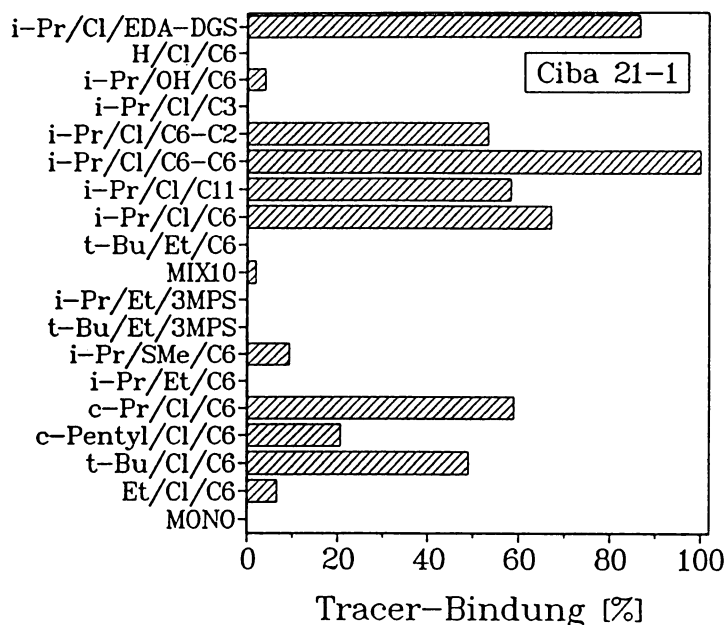


Abb. 70: Tracerbindung an mAK Ciba 21-1. Immunogen: i-Pr/Cl/C5, Antikörper Ciba 21-1 1:20.000, Entwicklung 5 min.

Das Immunogen des monoklonalen Antikörpers Ciba 21-1 besitzt große Ähnlichkeit mit den Immunogenen von C193, S84 und CWoNr. Nicht überraschen sollte daher das recht ähnliche Tracer-Pattern. Auch hier führt die Verwendung von längeren Spacern (i-Pr/Cl/C6C6 oder

i-Pr/Cl/EDA-DGS) zu einer verbesserten Bindung. Die Differenzierung von Alkylgruppen ist recht mäßig, Cyclopropyl- und t-Butyl-Reste werden ohne Probleme akzeptiert. Dagegen ist die Unterscheidung der Spacer-Anbindungsstelle extrem gut. Diese Aussage ist identisch mit der Aussage, daß der Chlorsubstituent zur Bindung unerläßlich ist. Eine Ausnahme bildet hier die bekannte Tatsache [46][322], daß Chloratome ungefähr durch Thiomethyl-Gruppen imitiert werden können. Der Tracer i-Pr/SMe/C6 besitzt kein Chlor und wird trotzdem noch ausreichend gebunden. Der Effekt einer Spacerverkürzung von C<sub>6</sub> auf C<sub>3</sub> ist extrem stark. Die Bindung verschlechtert sich um den Faktor 1000.

Das Immunogen des monoklonalen Antikörpers Ciba 20-9 (Abb. 71) unterscheidet sich nur durch den Ersatz des Chlors durch eine Hydroxygruppe vom vorhergehenden Antikörper. Merkwürdigerweise wird der Tracer aus dem Chlorderivat vergleichbar gut gebunden. Hier könnte wieder eine Bridge Recognition vorliegen. Dies wird durch die geringe Bindung von i-Pr/Cl/EDA-DGS untermauert. Größere Alkylgruppen führen zu einer immer noch ansehnlichen Bindung. Man könnte daraus schließen, daß die Bindungsstelle nicht optimal geformt ist um Kreuzreaktionen niedrig zu halten. Dies ist in Übereinstimmung mit der geringen Selektivität dieses Antikörpers (vgl. Ciba 85-3, Abb. 72). Hier tritt der seltene Fall auf, daß der empfindlichere Antikörper (20-9) unselektiver ist als der unempfindlichere (85-3). Es gibt also keine strenge Korrelation zwischen Selektivität und Sensitivität. Obwohl die Kreuzreaktion von Atrazin (i-Pr/Cl/Et) kleiner als 0.05 % ist, bindet die C<sub>6</sub>-Spacer-Variante (i-Pr/Cl/C6) extrem gut. Möglicherweise führt auch der Spacer zu einer Veränderung der Tertiärstruktur des Antikörpers, so daß Chlorderivate besser gebunden werden.

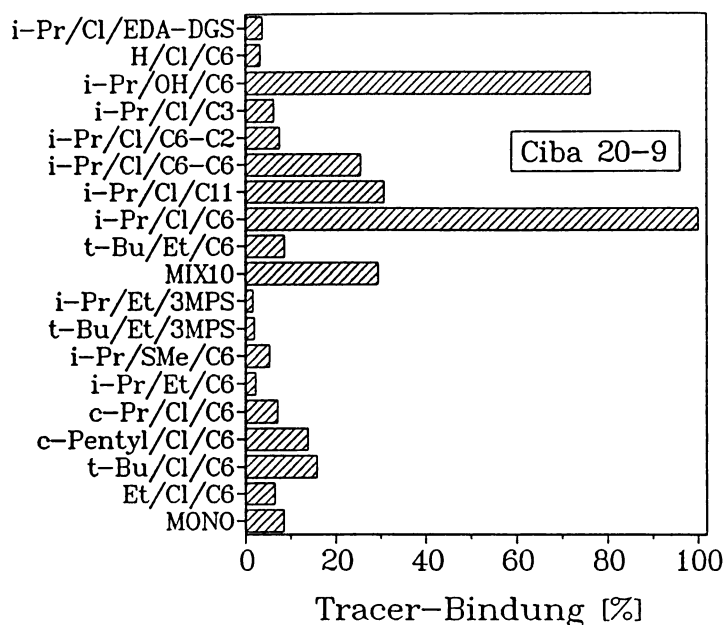
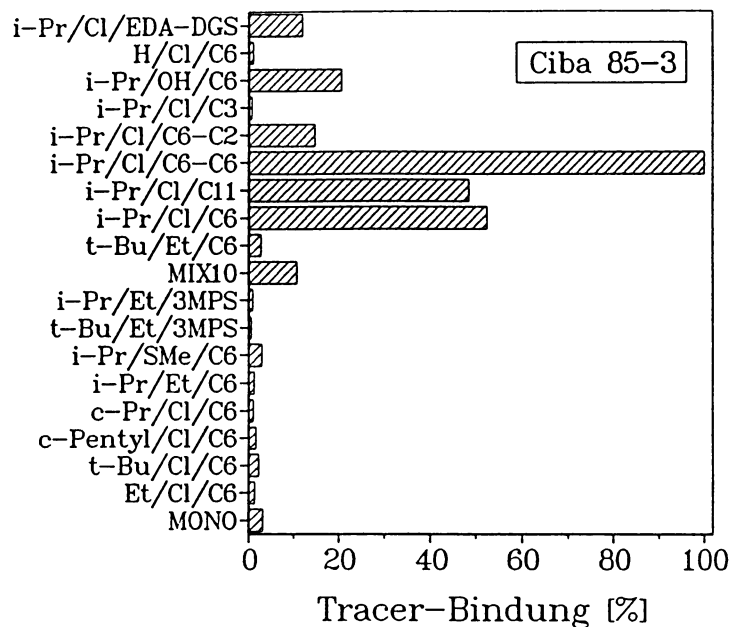


Abb. 71: Tracerbindung an mAK Ciba 20-9. Immunogen: i-Pr/OH/C5, Antikörper Ciba 20-9 1:5.000, Entwicklung 45 min.



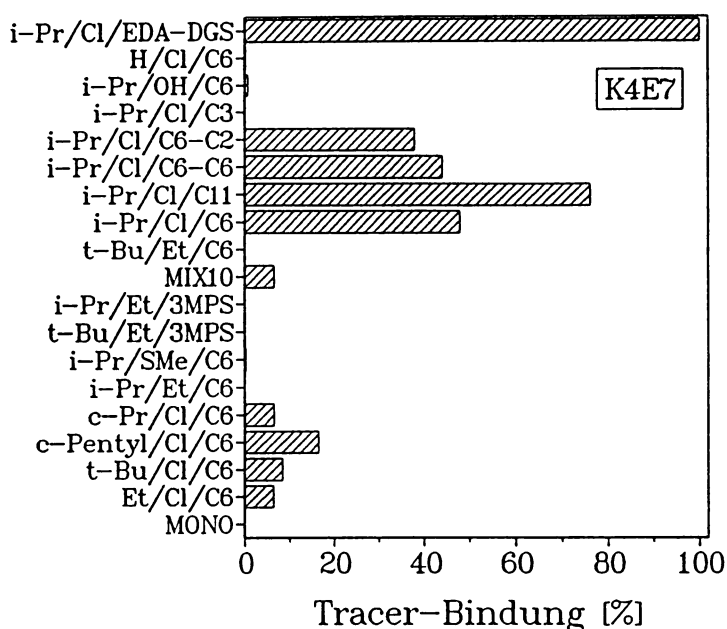
**Abb. 72:** Tracerbindung an mAK Ciba 85-3. Immunogen: *i-Pr/OH/C5*, Antikörper Ciba 85-3 1:5.000, Entwicklung 40 min.

Ciba 85-3 und Ciba 20-9 sind zwar beide monoklonale Hydroxyatrazin-Antikörper und mit dem gleichen Immunogen hergestellt worden, trotzdem unterscheiden sie sich in gewissen Aspekten. Der *i-Pr/Cl/C6-C6*-Tracer wird wesentlich besser gebunden, als der Hydroxytracer (*i-Pr/Cl/C6*). Dieses Verhalten bedarf einer Klärung, da das Immunogen nur einen  $C_5$ -Spacer besaß. Möglicherweise ist der *i-Pr/Cl/C6-C6*-Tracer mit einem Anteil Hydroxyderivat (Hydrolyseprodukt) kontaminiert. Aber auch der einfache *i-Pr/Cl/C6*-Tracer und sein C11-Homologes binden sehr gut. *i-Pr/Cl/EDA-DGS* bindet dagegen relativ schlecht, was wiederum auf Bridge Recognition hinweist. Ciba 85-3 ist im Gegensatz zu 20-9 sehr selektiv im Bezug auf die Variation der Alkylgruppe. Dies deckt sich weitgehend mit den Erkenntnissen von SCHLAEPPI et al. [187][188], die für Ciba 85-3 nur Hydroxyatrazin und Hydroxypropazin als stark bindende Haptene fanden, dagegen bei Ciba 20-9 eher eine Gruppenspezifität für viele Hydroxyderivate. Dies geht so weit, daß Ciba 20-9 sogar *i-Pr/OH/H* (Desethylhydroxyatrazin) mit 13 % oder *H/OH/H* (Ammelin) mit 1.7 % Kreuzreaktion detektiert.

Der monoklonale Antikörper K4E7 (Abb. 73) wurde mit einem ungewöhnlichen Immunogen hergestellt. Es sollte durch die Einführung einer Ethylgruppe ein Simazin-selektiver Antikörper erhalten werden. Kreuzreaktionsdaten liegen bisher nicht vor. Das Tracer-Pattern ist jedoch schon sehr aufschlußreich. Es ähnelt dem des mAK Ciba 21-1 in hohem Maße. Cyclopropyl- und t-Butylgruppen werden schlechter als von mAK Ciba 21-1 erkannt. Bei beiden Antikörpern wird der *i-Pr/Cl/EDA-DGS*-Tracer hervorragend gebunden. *i-Pr/Cl/C6*-oder C11-Derivate vermitteln auch hier gute Bindungseigenschaften. Eine Bevorzugung von Ethylderivaten läßt sich nicht belegen. Dies könnte ein Hinweis auf eine Beschränkung der



Diversität der Antikörper-bildenden Zellen einer Maus sein. Es würden dann über eine Art Kreuzreaktion durch verschiedene Immunogene ähnliche oder sogar identische Zellen aktiviert. Ein ähnlicher Komplex ist die hohe Kreuzreaktion von Propazin, die allen bisher untersuchten Atrazin-Antikörpern zu eigen ist. Diese Schwäche war resistent gegen alle Immunisierungsvarianten.



**Abb. 73:** Tracerbindung an mAK K4E7. Immunogen: Et/Cl/C6, Antikörper K4E7 1:10.000 (anti-Maus-IgG vorgecoatet 1:2500), Entwicklung 5 min.

Auch das Immunogen des monoklonalen Antikörpers P6A7 ist außergewöhnlich. Das reaktive Triazin i-Pr/Cl/Cl wurde direkt mit den Lysinresten eines Proteins umgesetzt. Zufällig besitzt das Produkt eine hohe Ähnlichkeit zu i-Pr/Cl/C6 (bzw. Atrazin). Dies spiegelt sich in der starken Bindung von i-Pr/Cl/C6-Derivaten. Die Differenzierung zwischen unterschiedlichen Alkylgruppen ist gering ausgeprägt, dagegen wirkt sich eine Substitution Chlor gegen Ethylamin (bzw. eine Verschiebung der Spaceranbindungsstelle) extrem aus. Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, daß trotz des fehlenden Spacers bei der Immunisierung die Verkürzung des Spacers von C<sub>6</sub> auf C<sub>3</sub> eine Abnahme des Signals um den Faktor 500 zur Folge hat. Das bedeutet zwangsläufig, daß der Lysinrest eine wichtige Rolle bei der Immunisierung gespielt hat. Trotzdem gehört der Antikörper P6A7 nicht zu den sehr empfindlichen Antikörpern. Dies unterstützt wiederum die Hypothese, daß der Lysinrest allein zur optimalen Präsentation des Haptens (bzgl. Spacerlänge) nicht ausreicht.

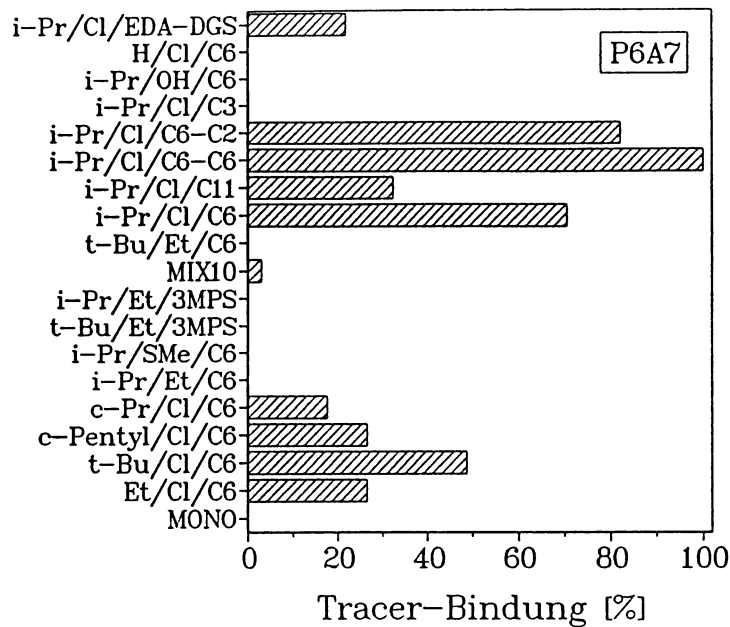


Abb. 74: Tracerbindung an mAK P6A7. Immunogen: i-Pr/Cl/Cl, Antikörper P6A7 1:10.000 (anti-Maus-IgG vorgecoatet 1:2500), Entwicklung 10 min.

Die drei monoklonalen Antikörper NMI 118, NMI 54 und NMI 21 wurden mittels eines Immunogengemisches "MIX10" (siehe S. 270) hergestellt. Es können daher nur Vermutungen angestellt werden, welches Hapten die Immunantwort ausgelöst hat. NMI 118 (detektiert Propazin, Terbutylazin und Atrazin) zeigt ein ungewöhnlich breites Spektrum (Abb. 75). Das hohe Signal des Cyclopentylderivats weist auf ein Hapten mit C<sub>6</sub>-Spacer und voluminöser Alkylgruppe (t-Bu/Cl/C6). Eine Beteiligung von schwefelhaltigen Derivaten kann ausgeschlossen werden, genauso von Derivaten ohne Chlor. Extrem lange Spacer bringen keine Verbesserung, was das C<sub>11</sub>-Derivat unwahrscheinlich macht. Ein kurzer C<sub>3</sub>-Spacer ist jedoch auch hier nicht ausreichend. Der mAK NMI 118 scheint eine schlechte Paßform an der Alkylgruppe aufzuweisen, jedoch sind Chlor und C<sub>6</sub>-Spacer (Bridge Recognition) wichtig. Dies entspricht in hohem Maße den Ergebnissen der Kreuzreaktionsmessungen (siehe S. 213). Auch hier wirkt sich der formale Verlust des Chlors viel stärker aus, als die Variation der Alkylgruppe.

Die Kreuzreaktionen der monoklonalen Antikörper NMI 54 (Abb. 76) und NMI 118 sind recht ähnlich. Diese Antikörper kann man offensichtlich in eine Gruppe einordnen. Dies spiegelt sich auch im Tracer-Pattern wider. Die Alkylselektivität ist hier etwas niedriger, die Bindung des langen Spacer-Derivats i-Pr/Cl/EDA-DGS hat sich deutlich verbessert. Auch hier ist eine starke Chlor-Selektivität vorhanden. Die erste Vermutung, daß es sich um ein und denselben Antikörper handelt, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Die höhere Sensitivität, die niedrigere Huminstoffempfindlichkeit (siehe S. 213 f.) und das doch signifikant veränderte Tracer-Spektrum legen es nahe, daß diese Antikörper individuelle Unterschiede aufweisen.

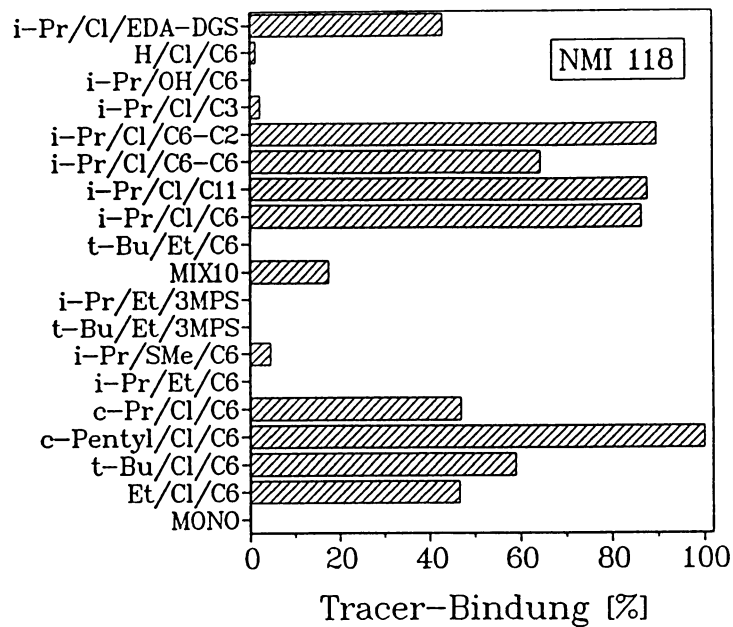


Abb. 75: Tracerbindung an mAK NMI 118. Immunogen: *i*-Pr/Cl/C3, *i*-Pr/Cl/C11, *i*-Pr/OH/C6, *t*-Bu/OH/C6, *t*-Bu/Cl/C6, H/Cl/C6, *i*-Pr/Et/3MPS, *t*-Bu/Et/3MPS, *i*-Pr/SMe/C6, Et/Cl/C6 (molares Gemisch), Antikörper NMI 118/1 1:25 (anti-Maus-IgG vorgecoatet 1:2500), Entwicklung 2 min.

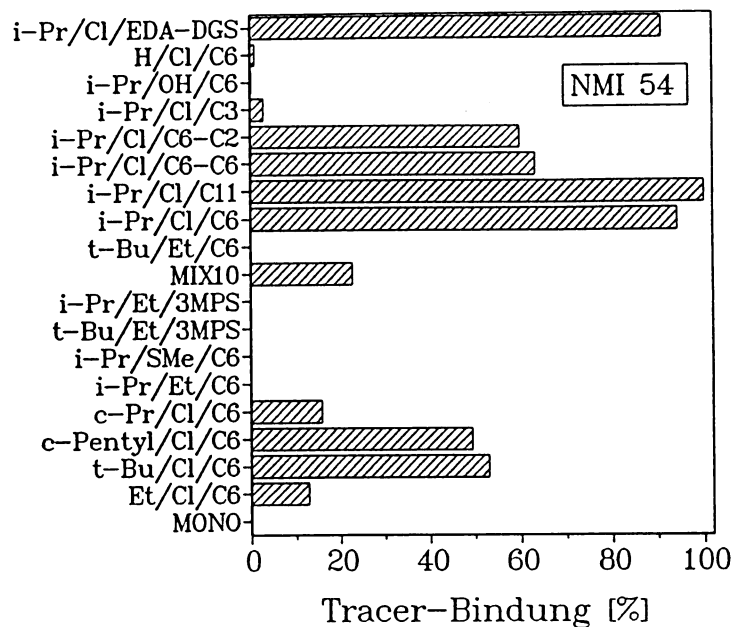
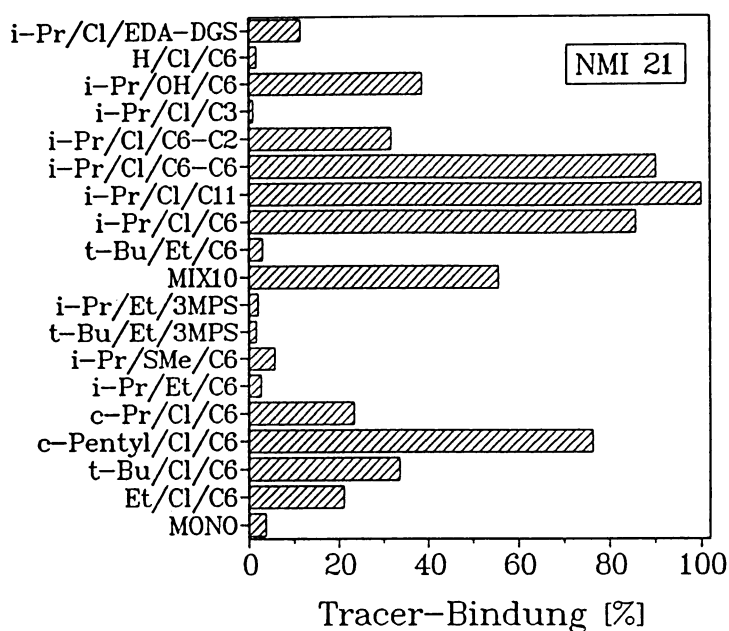


Abb. 76: Tracerbindung an mAK NMI 54. Immunogen: *i*-Pr/Cl/C3, *i*-Pr/Cl/C11, *i*-Pr/OH/C6, *t*-Bu/OH/C6, *t*-Bu/Cl/C6, H/Cl/C6, *i*-Pr/Et/3MPS, *t*-Bu/Et/3MPS, *i*-Pr/SMe/C6, Et/Cl/C6 (molares Gemisch), Antikörper NMI 54 1:25 (anti-Maus-IgG vorgecoatet 1:2500), Entwicklung 5 min.

Nicht auszuschließen ist jedoch, daß diese Zelllinien von einem Ur-Klon abstammen, der sich durch kleinere Mutationen in mehrere Varianten aufgespalten hat. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Experimentatoren gemacht ([187][188]). Ob sich diese Mutanten gezielt nutzen lassen, kann noch nicht genau beurteilt werden. Eine Sequenzanalyse dieser und anderer "verwandter" Antikörper wäre sicher sehr aufschlußreich.



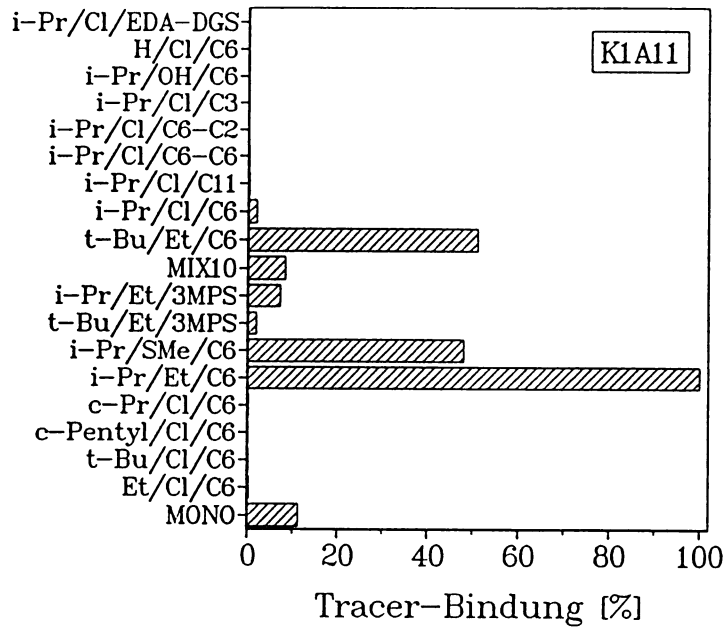
**Abb. 77:** Tracerbindung an mAK NMI 21. Immunogen: *i-Pr/Cl/C3*, *i-Pr/Cl/C11*, *i-Pr/OH/C6*, *t-Bu/OH/C6*, *t-Bu/Cl/C6*, *H/Cl/C6*, *i-Pr/Et/3MPS*, *t-Bu/Et/3MPS*, *i-Pr/SMe/C6*, *Et/Cl/C6* (molares Gemisch), Antikörper NMI 21 1:25 (anti-Maus-IgG vorgecoatet 1:2500), Entwicklung 30 min.

Obwohl es sich bei dem monoklonalen Antikörper NMI 21 (Abb. 77) um einen ausgeprägten Hydroxyatrazin-Antikörper handelt, ist eine deutliche Ähnlichkeit in den Tracer-Pattern zu den vorhergehenden Antikörpern zu erkennen. Der *i-Pr/Cl/EDA-DGS*-Tracer wird jedoch nur noch schwach gebunden, was auf eine ausgeprägte Bridge Recognition hinweist. Zudem wird das Hydroxyderivat (*i-Pr/OH/C6*) gut gebunden. Es ist erstaunlicherweise so, daß das Hydroxyderivat noch von vier Chlorderivaten in der Bindung übertroffen wird. Das Alkylgruppen-Pattern entspricht in hohem Maße dem des mAK NMI 118, wobei auch das Cyclopentylderivat (neben Isopropyl) bevorzugt wird. Auch der NMI 21 hat einen nahen Verwandten, den NMI 71 (hier nicht vermessen). Die frappierende Ähnlichkeit der Kreuzreaktionen läßt auch hier die Frage nach Identität oder Nichtidentität aufkommen. Die Kreuzreaktionen sind (außer Huminsäure) derart ähnlich (siehe S. 215), daß ich hier keine eindeutige Aussage treffen kann. Insgesamt stellt sich die Frage, ob nicht alle Antikörper der NMI-Serie von einer einzigen Zelle abstammen und nur Punktmutanten darstellen.

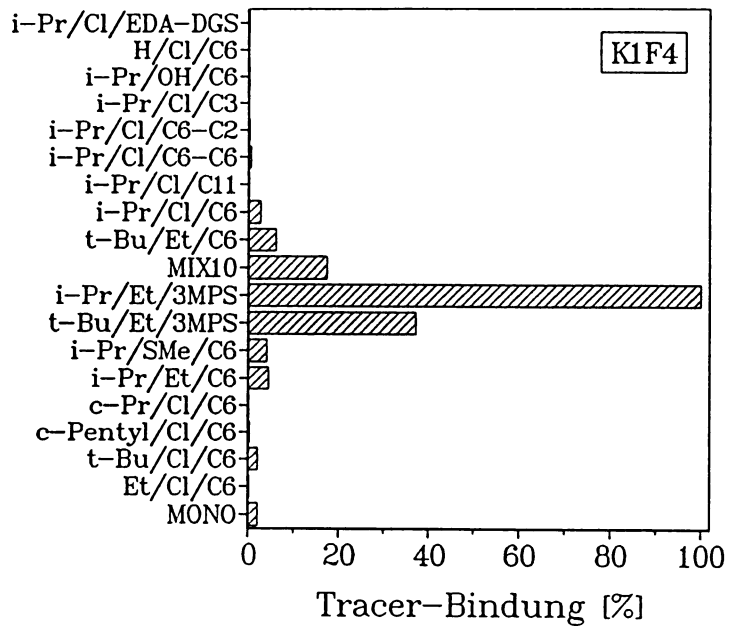
Die nächsten monoklonalen Antikörper wurden mittels der Ametrynsulfoxidmethode gewonnen. Sie zeigen, daß es durchaus Triazin-Antikörper mit völlig unterschiedlichen Tracer-

Pattern gibt. K1A11 (Abb. 78) bindet keines der Chlorderivate nennenswert. Der Antikörper ist extrem sensitiv gegenüber einer Spacer-Verschiebung bzw. einer Substitution Alkyl gegen Chlor. Substitution Alkyl gegen SMe wird weitgehend toleriert, so daß Thiomethylgruppen eine Art Mittelstellung zwischen Chlor und Alkyl-Substituenten einnehmen. Es deutet sich eine starke Bridge Recognition an, da die Mercaptopropionsäure-Derivate nicht gut gebunden werden. Dies bedeutet auch, daß das Immunogen vermutlich eine Aminogruppe (Lysin) besaß. In Zusammenhang mit den publizierten Kreuzreaktionsdaten (GIERSCH [200]) ergibt sich ein recht klares Bild: Dieser Antikörper detektiert vermutlich primär Melamine (Triamino-Triazine). Sowohl Thiomethyl- als auch Chlorderivate (Herbizide) werden nur noch mäßig gebunden.

Der monoklonale Antikörper K1F4 (Abb. 79), der mit Erfolg für die Bestimmung von Terbutylazin verwendet wird, besitzt einige interessante Eigenschaften. Obwohl er im Vergleich zu K1A11 durch eine identische Immunisierung gewonnen wurde, zeigt er ein völlig anderes Tracer-Spektrum. Hier sind die Mercaptopropionsäurederivate vorherrschend. Der bisher verwendete Tracer t-Bu/Et/C6 bindet nur sehr mäßig. Die Bindungseigenschaften (im Bezug auf die richtige Spacerstellung) sind zwischen K1A11 und K1F4 komplementär. K1F4 bindet die Melamin-Derivate nur gering. Auch eine Thiomethylgruppe an der falschen Stelle ist nicht ausreichend (i-Pr/SMe/C6). Wenn ein Antikörper überhaupt eine Funktion des Immunogens ist, so muß hier im Immunogen ein Schwefelsubstituent vorhanden gewesen sein. Geht man von der Identität der Immunogen-Präparate aus [201], so müssen freie Sulfhydryl-Gruppen im BSA verfügbar sein. In der Primärstruktur des BSAs ist ein freies Cystein vorhanden [350]. Dieses Immunogen besteht folglich aus einer "Mischung" der Ametrinsulfoxid-Derivate des Lysins und des Cysteins. Die relativ hohe Empfindlichkeit des mAK K1F4 gegenüber Triazin-Herbiziden ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß Thioalkylreste Chlor-Substituenten imitieren können, im Gegensatz zu Aminoalkylgruppen (siehe K1A11). Hier entspricht der am stärksten bindende Tracer (i-Pr/Et/3MPS) sehr weitgehend der Struktur des (chemisch) postulierten Immunogens.



**Abb. 78:** Tracerbindung an mAK KIA11. Immunogen: Ametrynsulfoxid, Antikörper KIA11 1:10.000 (anti-Maus-IgG vorgecoatet 1:2500), Entwicklung 15 min.



**Abb. 79:** Tracerbindung an mAK KIF4. Immunogen: Ametrynsulfoxid, Antikörper KF4 1:20.000, Entwicklung 25 min.

### 2.3 Verunreinigungen des Antikörpers

Dieses Thema hat interessanterweise viel mit "Brückenantikörpern" oder "Spacer Recognition" zu tun.

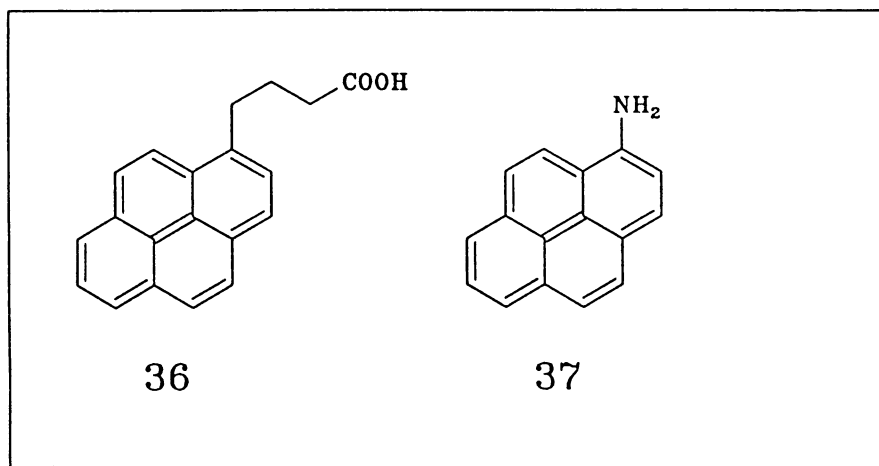


Abb. 80: 4-(1-Pyrenyl)-buttersäure, 1-Aminopyren.

So wurde bei einem neueren Projekt<sup>17</sup> zur Herstellung von Antikörpern für polycyclische Aromaten (PAK, PAH), und hier speziell dem Pyren, ein "Brückenantikörper"-Problem gefunden [304]. Antikörper, die mit einem Pyrenbuttersäure-Konjugat hergestellt wurden, ergaben im ELISA (mit Pyrenbuttersäure-Peroxidase als Tracer) unbrauchbare Eichkurven. Die Kurven waren flach mit einem extrem hohen "Untergrund". Dieses Ergebnis konnte auch gut reproduziert werden. Neben der "Brückenantikörper"-Hypothese wurde auch die Vermutung geäußert, Enzymkonjugate mit stark hydrophoben Resten, wie Pyren-Derivaten, würden unspezifisch von der Polystyrolplatte gebunden. Es sei daher nicht möglich, in normalen Polystyrolplatten ELISAs für hydrophobe Substanzen durchzuführen. Die übliche Strategie bestand darin, heterologe Kombinationen (in diesem Fall mit indirektem Testformat) auszutesten. Zu diesem Zweck wurde aus Aminopyren (Abb. 80) ein Diazoniumsalz hergestellt, das zur Kopplung mit BSA verwendet wurde. Die so durchgeführten Immunoassays zeigten eine normale Charakteristik und "bewiesen" damit die Richtigkeit der "Brückenantikörper"-Hypothese [304].

Da "Brückenantikörper"-Hypothesen aus theoretischen Gründen auf schwachen Füßen stehen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Gelegenheit genutzt, den tieferen Ursachen von "Brückenantikörpern" auf die Spur zu kommen. Dies war Ausgangspunkt von Experimenten, die die Art der beteiligten Wechselwirkungen genauer untersuchen sollten. Als erstes wurde versucht, die indirekte Testkonfiguration umzukehren. Dazu wurden vergleichbare heterologe

<sup>17</sup> Unter der Leitung von Herrn Dr. D. Knopp, Institut für Wasserchemie der Technischen Universität München.

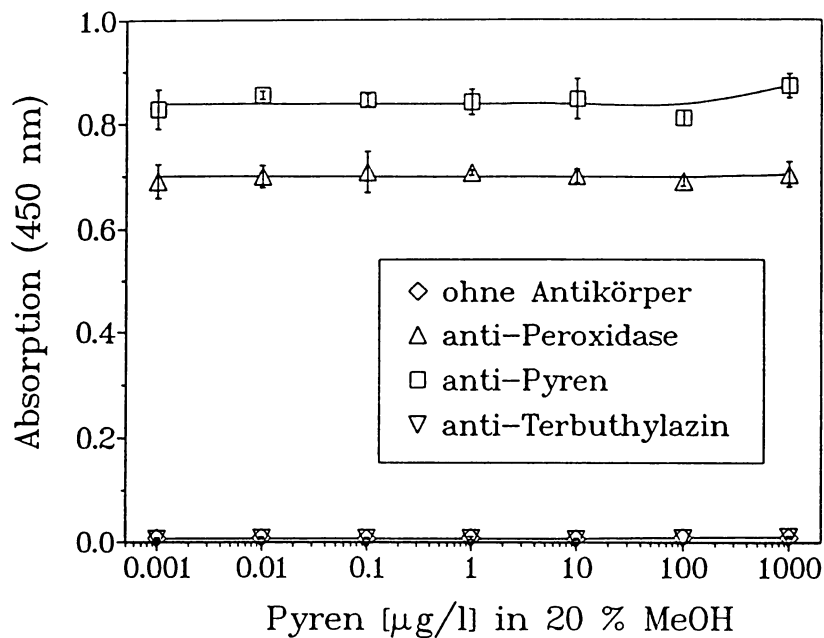
Konjugate mit Peroxidase hergestellt. Keines der heterologen Konjugate war in der Lage diese Antikörper ausreichend fest zu binden und irgendwelche Eichkurven zu erzeugen (Ergebnisse nicht dargestellt). Abgesehen von der hypothetischen Möglichkeit, daß diese Konjugate experimentell mißlungen waren, gibt es die Erklärung, daß Haptene von Enzym-tracern und von immobilisierten Protein-Konjugaten anderen Kriterien entsprechen müssen. Nimmt man bei Peroxidase-Tracern einen monovalenten Mechanismus an (siehe Abb. 27), so könnte bei indirekten Tests ein bivalenter Mechanismus überwiegen. Dies würde bedeuten, daß Antikörper in indirekten Tests mit wesentlich höheren Affinitäten gebunden werden als Tracer in der normalen Konfiguration. Normale ELISAs müßten daher viel besser bindende Haptene verwenden in Vergleich zu indirekten. Das heterologe Diazo-Pyren-Konjugat wäre in diesem Fall also schwach bindend, was für den indirekten ELISA ausreicht, für den normalen nicht.

Die nächsten Experimente waren in Hinsicht auf "Brückenantikörper" erfolgreicher. So wurde statt Pyrenbuttersäure-Peroxidase unmodifizierte Peroxidase als Tracer eingesetzt. Die Ergebnisse waren mehr als überraschend: Auch die reine Peroxidase wurde von diesem Serum gut gebunden und erzeugte eine waagerechte "Eichkurve" (Abb. 81).

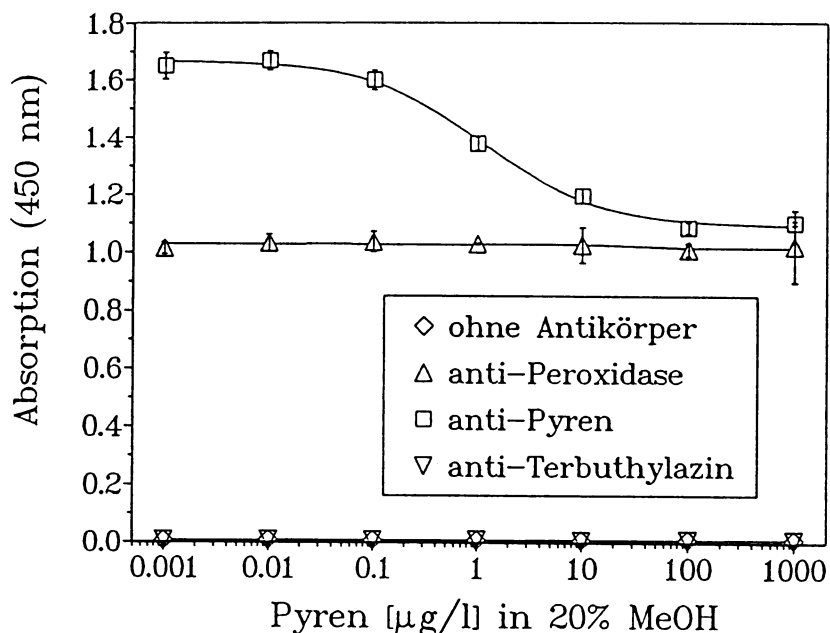
Schon diese Tatsache bringt beide Hypothesen ins Wanken: Es kann sich kaum um "Brückenantikörper" handeln, da in Peroxidase keine artifiziellen "Brückenmoleküle" vorhanden sind. Eine unspezifische Bindung durch hydrophobe Haptene ist auch ausgeschlossen, da ebenfalls keine vorhanden sind.

In Abb. 82 ist der Gegenversuch mit Pyrenbuttersäure-POD als Tracer dargestellt. Auch diese Ergebnisse stehen in krassem Widerspruch zu den vorher genannten Hypothesen. Der Pyren-Tracer wird ohne Antikörper oder mit unpassenden Antikörpern (K1F4) nicht signifikant gebunden. Ein unspezifischer Mechanismus kann daher eindeutig ausgeschlossen werden.





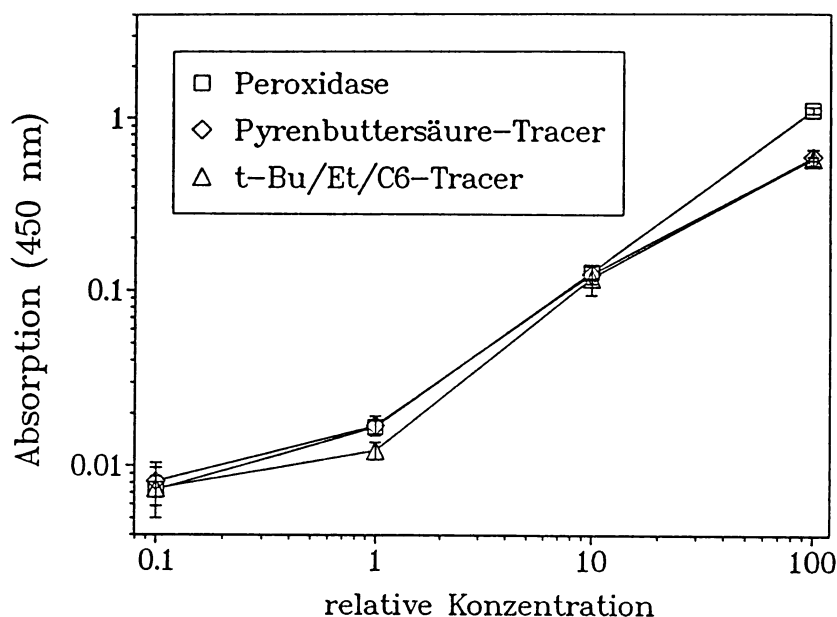
**Abb. 81: Unmodifizierte Peroxidase als "Tracer".** Antikörper: anti-Peroxidase (Sigma) 1:10.000, anti-Pyren (Nr. 16.89) 1:10.000, anti-Terbuthylazin (monoklonal, K1F4) 1:10.000, 200 µL ca. 18 h 4 °C, Vorinkubation 10 min, 200 µL, "Tracer": Peroxidase (Boehringer),  $A_{403 \text{ nm}} = 0.205$ , 1:1000, 15 min, Entwicklung: anti-POD 2 min, Rest 10 min.



**Abb. 82: Pyrenbuttersäure-Peroxidase als Tracer.** Antikörper: anti-Peroxidase (polykl., Sigma) 1:10.000, anti-Pyren (polykl., Nr. 16.89) 1:10.000, anti-Terbuthylazin (monokl., K1F4) 1:10.000, 200 µL ca. 18 h 4 °C, Vorink. 10 min, 200 µL, Tracer: Pyrenbuttersäure-POD,  $A_{403 \text{ nm}} = 0.465$ , 1:2000, 15 min, Entwicklung: anti-POD 2 min, Rest 10 min.

Das Problem der unspezifischen Bindung wurde in einem neuen Versuch genauer untersucht. Es wurden drei "Tracer", Peroxidase (POD), Pyrenbuttersäure-POD und t-Bu/Et/C6-POD über ihre Absorption bei 403 nm (Soret-Bande) auf gleiche Konzentrationen gebracht. Dann wurde mit diesen Stammlösungen eine Verdünnungsreihe hergestellt und diese auf eine unbeschichtete Mikrotiterplatte pipettiert.

Das Ergebnis ist in Abb. 83 dargestellt. Es lassen sich keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Tracern ausmachen. Der Einfluß des gekoppelten Haptens auf die unspezifische Adsorption ist auch bei sehr hydrophoben Resten gering. Rechnet man die Konzentration des Tracers auf Verdünnungen um, die bei Immunoassays üblich sind, so kann gesagt werden, daß die unspezifische Adsorption eine sehr kleine Rolle spielt. Dieser Effekt wird noch geringer, verwendet man Antikörper-beschichtete Platten, da hier die besten Adsorptionsstellen schon besetzt sind.

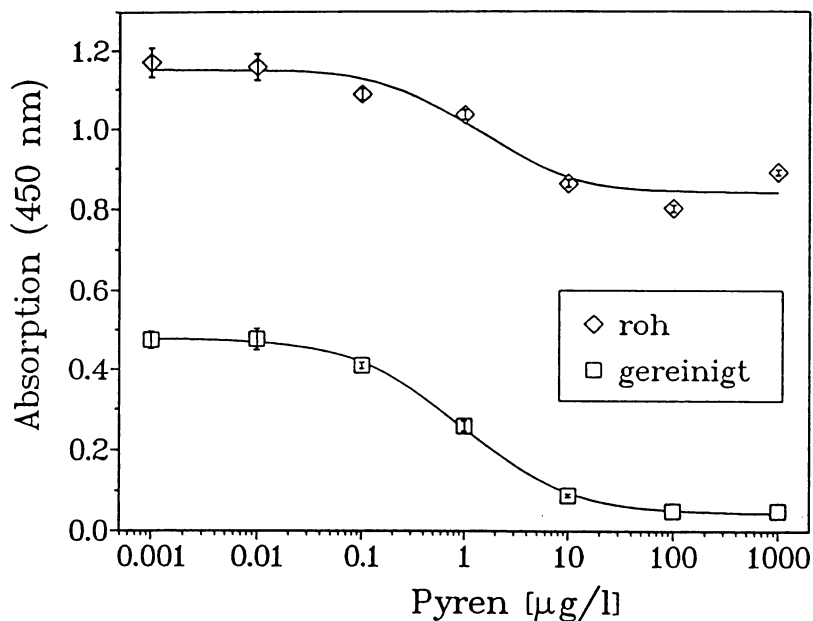


**Abb. 83:** Vergleich der unspezifischen Adsorption von Tracern an Polystyrol. Antikörper: entfällt, Inkubation Tracer bzw. POD: 200  $\mu$ L, 15 min, Konzentration: variabel, normiert auf  $A_{403 \text{ nm}}$ , Entwicklung: 10 min, Fehlerbalken: 2s.

Die Lage der anti-Pyren-Kurve in Abb. 81 kann als Indiz gewertet werden, daß in diesem Serum anti-Peroxidase-Antikörper auftreten und Peroxidase unabhängig von ihrer Modifizierung binden. Zur Verifizierung dieser Annahme wurde ein polymerer Träger (VA-Epoxy, Riedel-de Haën) mit nativer Peroxidase gekoppelt. Diese Affinitätsmatrix wurde mit dem Pyren-Serum vermischt um die anti-Peroxidase-Antikörper zu binden. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das gereinigte Serum wie üblich verwendet. Der Effekt war erstaunlich: Abb. 84 zeigt die parallel gewonnenen Eichkurven. Es ist offensichtlich, daß das affinitätsgereinigte Serum einen völlig normalen ELISA ermöglicht.

Die Probleme, die bisher aufgetreten sind, wurden nur durch die Anwesenheit von anti-Peroxidase-Antikörpern verursacht. Wie diese Antikörper entstehen konnten, ist jedoch weitgehend unklar. Ob eine Verunreinigung des Immunogens mit einer pflanzlichen Peroxidase die Ursache ist oder ob es gewisse Homologien [414] zwischen Immunogen (Hämocyanin, KLH) und Peroxidase gibt, muß unbedingt geklärt werden. Besonders gefährdet sind möglicherweise Glycoproteine, da es denkbar erscheint, daß an unterschiedlichen Proteinen partiell identische Zuckerreste hängen. Da ähnliche Beobachtungen ("Brückenantikörper") sehr häufig sind, sind diese Ursachen zwar nicht auszuschließen, aber nicht sehr wahrscheinlich.

Viel eher könnte man eine "unspezifische" Immunisierung eines Tiers vermuten. So könnte durch die starke allgemeine Aktivierung des Immunsystems durch das Freundschs Adjuvans eine "Überimmunisierung" auftreten, die eine Produktion von vielerlei mit den immunogenen Determinanten unkorrelierten Antikörpern auslösen könnte. Auch zu große Mengen Immunogen könnten möglicherweise die Bildung von unerwünschten Antikörpern fördern.



**Abb. 84:** Affinitätsreinigung von anti-Pyren-Antikörpern. Antikörper: anti-Pyren Nr. 16.89 (roh), 1:20.000, anti-Pyren Nr. 16.89 (affinitätsgereinigt), 1:500, 48 h, 200  $\mu\text{L}$ , 4 °C, Vorinkubation 30 min, 200  $\mu\text{L}$ , Tracer: Pyrenbuttersäure-POD 1:20.000, 15 min, 100  $\mu\text{L}$ , Entwicklung 10 min.

Diese Hypothese wird durch neuere Untersuchungen zu sog. "Superantigenen" gestützt [415], in denen ein unspezifischer Mechanismus der Stimulation von Immunzellen nachgewiesen werden konnte. Schon lange ist bekannt, daß Endotoxine und *Bordetella pertussis* B- und T-Zellen stark anregen. Bei detaillierteren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß Enterotoxine, die von *Staphylococcus aureus* hergestellt werden, bis zu 20 % der Immunzellen im Organismus aktivieren können. Dieser Vorgang hat weitreichende Folgen,

die von toxischem Schock bis zu Autoimmunkrankheiten reichen können. Gerade das Auftreten von Autoimmunkrankheiten [416] zeigt die Breite der immunologischen Stimulation durch diese bakteriellen Toxine. Es erscheint offensichtlich, daß von den hunderten Millionen aktivierter Klone auch zufällig z.B. peroxidasebindende Antikörper produziert werden können. Folglich müßte man untersuchen, ob selektivere Immunisierungsmethoden das Auftreten von "Brückenantikörpern" minimieren würden. Es muß geprüft werden, ob die Häufigkeit von "Brückenantikörpern" mit der Anwendung von Freundschem Adjuvans (oder ähnlichen bakterienhaltigen Präparaten) zusammenhängt. Es ist denkbar, daß bei Immunisierungen ein Kompromiß zwischen Quantität (Titer) und Qualität (selektive Bildung von Antikörpern) gefunden werden muß. Die Devise "Viel hilft viel" dürfte auch hier zu suboptimalen Ergebnissen führen.

Ein in diesem Zusammenhang besonders interessanter Fall wurde von KNIGHT et al. [417] berichtet. Die Autoren beschreiben eine sehr ähnliche Situation: Ein Cotinin-RIA zeigte Eichkurven, die ca. 50% nicht-kompetitionsfähige Bindung aufwiesen ("Sockel"). Die Antikörper waren (ähnlich wie der Pyren-Antikörper) mit einem KLH-Hapten-Konjugat gewonnen worden. An KLH gekoppeltes Nicotin (strukturell dem Cotinin sehr ähnlich) wurde zum Antiserum gegeben und das Präzipitat verworfen. Dieses absorbierte Serum zeigte ein normales Verhalten. Die Autoren interpretieren die Vorgänge als Entfernung von "Brücken"-Antikörpern. Dies erscheint jedoch als eher unwahrscheinlich. Aus sterischen Gründen ist es kaum möglich, daß ein Antikörper die Brücke, aber nicht das Hapten bindet. Wenn nur eine zu hohe Affinität des Tracers (Iodiertes Tyramin-Hapten) die Ursache wäre, könnte eine erhöhte Analytkonzentration Analyt den Tracer doch verdrängen ("cross reactivity" [299]). Da dies nicht der Fall ist, muß "shared reactivity" vorliegen, d.h. es ist mehr als eine Antikörperpopulation beteiligt. Auch die durchgeführten Verdrängungsexperimente mit unmarkiertem Tracer weisen eindeutig in diese Richtung.

Sehr aufschlußreich ist die Bemerkung, daß ein analoges Experiment, das Serum durch ein an Amino-Agarose gekoppeltes Nicotin-Derivat zu reinigen, völlig gescheitert ist. Dies widerspricht grob der Annahme von Brückenantikörpern, da ja in diesem Fall die Brücke am Nicotin-Derivat gleichermaßen vorhanden war. Meines Erachtens liegt hier ein völlig unabhängiger Prozeß vor. Beispielsweise könnte man sich vorstellen, daß eine "Überimmunisierung" vorgenommen wurde, die nach allgemeiner Auffassung oft zur Bildung von nicht mit dem Immunogen zusammenhängenden Antikörpern zur Folge hat. Diese "unspezifischen" Antikörper können nun u.a. auch Peroxidase oder Tyramin-Derivate binden. Absorbiert man nun mit einem passenden Carrier die störende "unspezifische" Fraktion (nicht unbedingt alle Fraktionen), so sind plötzlich alle Störungen beseitigt. Interessant ist die Frage, ob die Absorption des Cotinin-Serums auch mit einer Tyramin-Matrix oder immobilisiertem KLH (ohne Hapten) erfolgreich gewesen wäre. Dies ist zumindest wahrscheinlich, da bei dem hier untersuchten Pyren-Serum reine Peroxidase, ohne jegliche Kopplung von homologen oder heterologen Haptenen, ausreichte.

Die Verwirrung, die auf dem Gebiet der "Brückenantikörper" herrscht, wird noch deutlicher, wenn man sich eine weitere Arbeit über Cotinin-Antikörper [418] betrachtet, die sich explizit auf den Artikel von KNIGHT et al. bezieht. Hier wurde das Serum mit vernetztem BSA absorbiert. Mit dem "homologen" Iod-Tracer wurden enttäuschend unempfindliche Eichkurven für Cotinin erhalten. Dagegen wurde das homologe Hapten gut erkannt. Kurzin-kubation führte zu einer Verbesserung, die jedoch aus technischen Gründen nicht genutzt werden konnte. Die Synthese eines heterologen Iod-Tracers führte zu einer Verbesserung der Empfindlichkeit um den Faktor 100. Dies wurde auf die Beseitigung eines Brückenantikörper-Problems zurückgeführt. Die Autoren erkannten selbst einen gewissen Widerspruch, ohne jedoch ihre Interpretation zu überdenken: Trotz des heterologen Tracers wird das homologe Hapten ca. 200fach stärker gebunden als Cotinin (Kreuzreaktion ca. 20.000 %). Dies macht die Existenz eines Brückenproblems sehr unwahrscheinlich. In diesem Fall scheint es sich viel eher um den üblichen Effekt durch schwach bindende Tracer zu handeln. Eine vergleichbare Verbesserung hätte man vermutlich auch durch eine sinnvolle Verdünnung des Tracers erhalten.

Interessanterweise ist die Methode durch immobilisierte Haptene oder Antigene Seren zu reinigen und deren Charakteristik zu verändern schon ziemlich alt. LANDSTEINER und VAN DER SCHEER [10] zeigten im Jahr 1936, daß durch "Absorption" von Seren mit immobilisierten Phenylderivaten die Kreuzreaktionen stark veränderbar sind. Sie schlossen aus diesen und ähnlichen Experimenten [419] völlig richtig, daß Antiseren polyklonaler Natur sein müssen.

#### 2.4 Verunreinigungen des Tracers

Im Bezug auf Enzymtracer konnte an einem sehr instruktiven Beispiel gezeigt werden, welchen Einfluß Verunreinigungen, insbesondere des Haptens, haben können. Der polyklonale Antikörper C10, der bevorzugt desalkylierte Triazine bindet, benötigt auch einen entsprechenden Tracer. Hierzu wurde das homologe Hapten H/Cl/C6 synthetisiert. Dies war jedoch nicht ohne Hindernisse zu erreichen, da Ammoniak üblicherweise nur in wässriger Form gehandhabt wird. Aus diesem Grund wurde die Substitutionsreihenfolge umgekehrt, d.h. zuerst sollte der Spacer angebracht, dann die Aminogruppe eingeführt werden. Diese Strategie hat sich als ungeeignet herausgestellt, da die Triazincarbonsäure sofort in die (alkalische) wässrige Phase übergeht und dort eine Zweitsubstitution nur schwer verhindert werden kann. Daher fällt als Produkt vorwiegend C6/Cl/C6 an. Auch bei modifizierten Syntheseschritten ist es nicht einfach, ein ausreichend reines Produkt zu erhalten. Es wurde nun mit diesem C6/Cl/C6-Hapten, das eigentlich nur geringe Ähnlichkeit zum Immunogen hat, ein Peroxidase-Tracer hergestellt. In Abb. 85 werden drei Tracer gegenübergestellt, der homologe H/Cl/C6-Tracer, der "Nebenprodukt"-Tracer C6/Cl/C6 und der für viele Atrazin-Antikörper nützliche i-Pr/Cl/C6-Tracer.

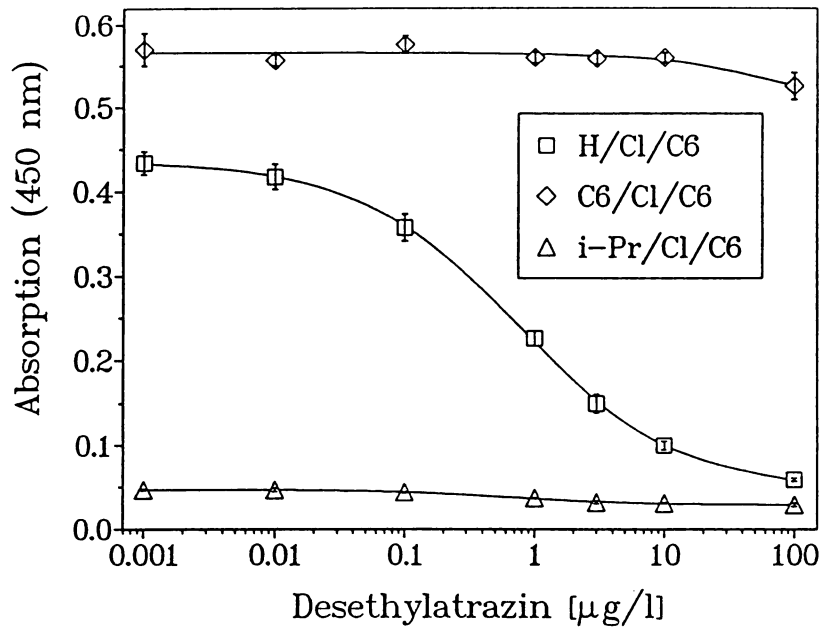
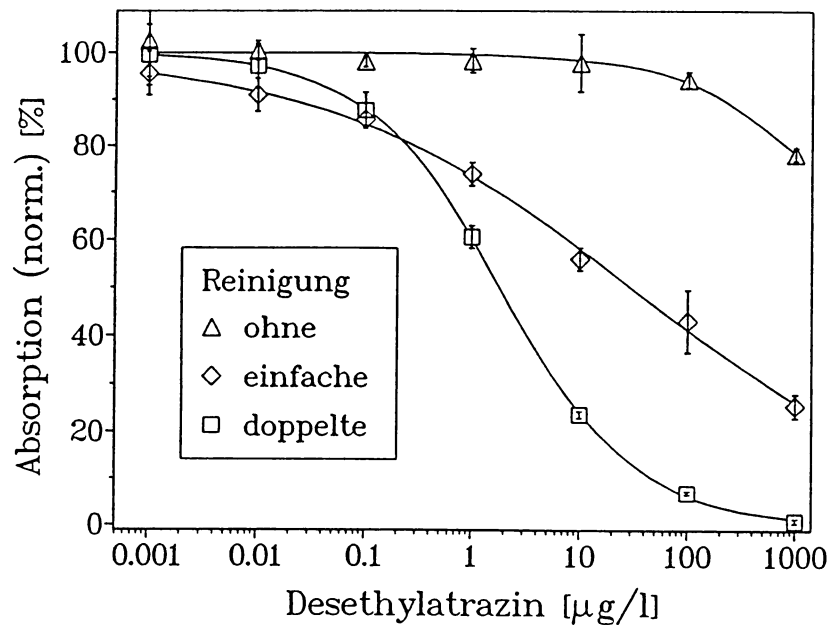


Abb. 85: Vergleich von Desalkyltracern. Antikörper: C10 1:10.000, 5 h, 200  $\mu\text{L}$ , RT, Vorinkubation 30 min, 200  $\mu\text{L}$ , Tracer: H/Cl/C6, 1:20.000, C6/Cl/C6, 1:20.000, i-Pr/Cl/C6 1:20.000, 10 min, 100  $\mu\text{L}$ , Entwicklung 10 min.

Der Atrazin-Tracer verhält sich so wie man es erwarten würde: Er wird von den Antikörpern kaum gebunden. Die Alkylgruppe ist viel zu groß, um in die Bindungsstelle zu passen. Der homologe Tracer ergibt eine schöne Eichkurve. Völlig aus dem Rahmen fällt der Tracer, der mit Hilfe des Nebenprodukts erzeugt wurde. Er bindet an den Antikörpern extrem stark, ohne jedoch eine brauchbare Eichkurve zu ergeben. Dies ist vielleicht der erste direkte Nachweis eines "Brücken-Antikörpers", jedoch nicht im üblichen Sinn. Diese "Brückenantikörper" entsprechen wahrscheinlich Antikörpern gegen Verunreinigungen, vermutlich schon im Hapten des Immunogens.

Weitere Experimente konnten diese Interpretation wesentlich erhärten. Es wurden Enzymtracer aus unterschiedlich stark gereinigten Hapten-Fractionen hergestellt. Die Abstufungen der Reinheit wurden durch einfaches oder doppeltes Umkristallisieren erhalten. In Abb. 86 sind die resultierenden Eichkurven dargestellt. Nur das hochgereinigte Produkt ergibt eine optimale Kurve. Auch geringe Mengen von Synthese-Nebenprodukten führen zu starken Empfindlichkeitseinbußen. Die dann erhaltenen ungünstigen Eichkurven würden vom unvoreingenommenen Betrachter leicht als Spacer Recognition des homologen Haptens interpretiert. Genau das Gegenteil ist richtig. Der reine homologe Tracer ergibt einen hervorragenden Test. Erst ("heterologe") Verunreinigungen verursachen die Verschlechterung.



**Abb. 86:** Effekt der Aufreinigung des Haptens für die Tracer-Synthese. Antikörper: C10 1:20.000, ca. 18 h, 200  $\mu\text{L}$ , 4 °C, Vorinkubation 10 min, 200  $\mu\text{L}$ , Tracer: H/Cl/C6 (mehrfach gereinigtes Hapten), 1:100.000, H/Cl/C6 (einfach gereinigt), 1:40.000, H/Cl/C6 (roh) 1:40.000, 15 min, 100  $\mu\text{L}$ , Entwicklung 12 min, 5 min, 5 min.

## 2.5 Schlußfolgerungen

Man sollte zwei grundsätzlich verschiedene Typen von "Brückenantikörpern" unterscheiden. Hier sollen sie "Brückenantikörper" erster Art und zweiter Art genannt werden, obwohl die letzteren ihren Namen eigentlich zu Unrecht tragen.

Brückenantikörper erster Art sind Antikörper, die tatsächlich die Brücke, d.h. den Spacer zwischen Hapten und Protein erkennen. Diese Antikörper haben offensichtlich keine ungewöhnlich negativen Eigenschaften. Im Gegenteil, Brückenantikörper erster Art scheinen hohe Affinitäten auch zum Analyten aufzuweisen und sollten daher sogar gezielt hergestellt werden.

Brückenantikörper zweiter Art verhalten sich völlig anders. Sie verursachen flache Eichkurven mit oft hoher "unspezifischer" Bindung. Es spricht viel dafür, daß diese Antikörper nicht das geringste mit Brücken, Spacern oder ähnlichem zu tun haben und insofern am ehesten in die Kategorie "Artefakt" gehören.

Die Tatsache, daß "Brückenantikörper" ein in der Praxis tatsächlich oft auftretendes Problem sind, unterstreicht die Wichtigkeit einer genauen Analyse. Da die Bindung eines Tracers bei Brückenantikörpern zweiter Art auch durch beliebig hohe Analytkonzentrationen nicht

inhibiert werden kann, so kann man erwarten, dass dieses Phänomen nur bei polyklonalen Antikörpern auftritt. Dies entspricht auch der Beobachtung in dieser Arbeit. Folglich müssen mehrere Antikörperfraktionen beteiligt sein. Im Gegensatz zu der im Namen des Phänomens implizierten Kausalität, scheinen eher Verunreinigungen des Haptens bzw. des Serums entscheidend am Auftreten von "Bridge Recognition" beteiligt zu sein. Durch wirksame Reinigungsprozeduren konnten alle negativen Effekte völlig beseitigt werden. Der erfolgreiche Einsatz von heterologen Tracern kann möglicherweise auf die synthesebedingten Unterschiede in den Verunreinigungen zurückgeführt werden. Immunogen und Tracer enthalten dann unterschiedliche Verunreinigungen, die nicht mehr interferieren. "Bridge Recognition" (zweiter Art) könnte man dann weitgehend mit "Shared Reactivity" (BERZOFSKY und SCHECHTER [299]) gleichsetzen.

Ein weiterer Mechanismus des Heterologie-Prinzips konnte nachgewiesen werden. So wurden weitgehend alle erfolgreichen Heterologie-Experimente bei konstanten Tracer-Konzentrationen durchgeführt. Es ist logisch, dass stark bindende (z.B. homologe) Tracer das Vergleichsgewicht stark stören und somit eine Verschlechterung des Testmittelpunkts verursachen. Dieses Problem lässt sich aber extrem einfach lösen: Es ist nur notwendig für jeden neuen Tracer eine optimale Konzentration zu finden. In diesem Fall sind stark bindende Tracer den schwach bindenden ebenbürtig. Eine einfache Überlegung ausgehend von der vereinfachten Vorstellung eines Antikörper-Tracer-Gleichgewichts zeigt, dass nicht die Tracerkonzentration, sondern das Produkt aus Affinitätskonstante und Konzentration konstant gehalten werden muß. In einer komplexeren Simulation konnte gezeigt werden, dass schwach bindende Tracer sogar Nachteile mit sich bringen, die mit der unerwünschten Dissoziation im Waschschrift zusammenhängen.

Bei monoklonalen Antikörpern scheint es auszureichen, einen genügend stark bindenden Tracer herzustellen. Das geeignete Hapten kann z.B. durch Kreuzreaktionsexperimente ermittelt werden. Häufig reicht auch einfach die Verwendung des homologen Haptens aus. Bei polyklonalen Antikörpern kann es ähnlich sein, muß es aber nicht. Dies hängt damit zusammen, dass durch unterschiedliche Tracerstrukturen unterschiedliche Antikörperfraktionen angesprochen werden können. Es ist klar, dass durch einen tracerbedingten Fraktionswechsel sämtliche Parameter, wie Empfindlichkeit, Kreuzreaktionen und Titer verändert werden. Es handelt sich dann um prinzipiell unabhängige Tests. Diese Variationen konnten bei monoklonalen Antikörpern erwartungsgemäß nicht gefunden werden.

Zwar wurde kürzlich ein Einfluß zahlreicher Parameter wie Spacerlänge, Enzym, Coatingprozedur und Haptenstruktur auf die Empfindlichkeit eines Atrazin-ELISAs basierend auf einem monoklonalen Antikörper postuliert [207]. Die Ergebnisse können jedoch allesamt als Artefakt der Tracer- bzw. Antikörperverdünnung angesehen werden. So ist immer diejenige Testkonfiguration überlegen, die (zufälligerweise ?) die niedrigste Tracerkonzentration aufweist.



Besonderer Erklärungsbedarf besteht im Bereich der indirekten ELISAs, da hier fast bei jedem Test unglaubliche Mengen an "Brückenantikörpern" auftreten sollen. Die tatsächlich existierenden Probleme können oft durch die Anwendung heterologer Antigene behoben werden, was die obige Annahme scheinbar stützt [420][281]. Es ist jedoch unglaublich, daß eher kleine, strukturell unauffällige Strukturen, wie sie die meisten Spacer darstellen, solch pathologisch starke Immunantworten auslösen und dabei noch Antikörper hervorrufen sollen, die extrem hohe Affinitäten aufweisen. Viel eher erscheinen die in diesem Kapitel aufgeführten Ursachen bei indirekten ELISAs verstärkt aufzutreten. Die grundlegende Ursache dieser negativen Effekte ist die Multivalenz der immobilisierten Antigene, die abgeschwächt auch bei Enzymen wie der Alkalischen Phosphatase auftritt. Auf diese Weise werden stark bindende (z.B. homologe) Haptene extrem stark gebunden. Dies führt zu einer ungenügenden Konkurrenz des Analyten. Zudem wirken sich hier Verunreinigungen aus dem gleichen Grund viel stärker aus. Sie induzieren Antikörper, die logischerweise den Analyten oft überhaupt nicht, dafür die "homologe" Verunreinigung hervorragend binden. Folglich kann auch keine Konkurrenz mit dem eigentlichen Analyten auftreten.

Eine weitere Quelle von vermeintlichen "Brückenantikörpern" dürfte die Anwendung von falschen Haptenen zur Immunisierung sein. Denn stellt man sich eine völlig unähnliche Struktur von immunogenem Hapten und Analyt vor, so entstehen nur Antikörper gegen das strukturell falsche Hapten. Bei einem indirekten Immunoassay würde man eine starke Bindung der Antikörper an das homologe (falsche) Konjugat feststellen, die durch den Analyten in keiner Weise inhibierbar wird. Hier sollten jedoch auch heterologe Systeme nichts ausrichten können. Dieses Phänomen hat logischerweise auch nichts mit Spacern oder Brücken zu tun.

Man kann also u.a. folgende Maßnahmen ergreifen, um "Brückenantikörper" zweiter Art zu vermeiden: Die Immunisierung sollte so selektiv wie möglich ablaufen, eine unspezifische Anregung des Immunsystems könnte kontraproduktiv sein. Dann kann das Immuneserum zuerst mit immobilisiertem Carrier absorbiert werden, um größere Mengen irrelevanter Antikörper zu entfernen. Die störenden "Brückenantikörper" zweiter Art können anschließend durch Adsorption mit immobilisiertem Marker (Enzym o.ä.) abgetrennt werden. Antikörper unerwünschter Kreuzreaktion können durch Adsorption mit immobilisiertem kreuzreagierendem Stoff beseitigt werden, sofern mehrere Antikörperfraktionen am Signal beteiligt sind.

Eine in sich geschlossene Interpretation dieser Erkenntnisse könnte man vom allgemeinen Entropiebegriff ableiten. Sieht man eine analytische Probe als ein Gemisch sehr vieler Stoffe an, so ist die (Mischungs-)Entropie in diesem System maximal geworden. Will der Analytiker nun diese Mischung in Einzelkomponenten auftrennen, um sie zu quantifizieren, so muß die Entropie der Probe erniedrigt werden, was ohne Energiezufuhr nicht möglich ist. Diese Energiezufuhr kann z.B. durch aufwendige Trennprozeduren realisiert werden. Bei immunologischen Tests findet eine Trennung der Komponenten nur implizit statt. Folglich müssen die Immunreagenzien selbst die notwendige Energie zur Trennung der Probe beinhalten. Bei dieser Sichtweise kann man erkennen, daß bei immunologischen Tests mindestens ein

Element vorhanden sein muß, das eine niedrige Entropie aufweist, d.h. sich in einem hochreinen Zustand befindet. Sind alle Komponenten zu stark verunreinigt, so ist die Trennung der Probenkomponenten nicht mehr möglich, da Mischungsvorgänge nicht spontan rückwärts ablaufen. Etwas verkürzt könnte man sagen, daß Reagenz-Mischungen für die Analyse von Substanz-Mischungen nicht geeignet sind. Mindestens ein selektives Element ist unabdingbar.

Zusammenfassend kann man festhalten, daß "Brückenantikörper" und verwandte Phänomene wahrscheinlich Artefakte darstellen, die bei monoklonalen Antikörpern, optimierten Haptenen und hochgereinigten Reagenzien nicht auftauchen sollten. Bridge Binding mußte bisher als Sammelbegriff für vielerlei Mängel eines Immunoassays herhalten, ohne daß sich der postulierte Mechanismus auf molekularer Ebene festmachen ließ.

### **3 Sensitivität**

#### **3.1 Allgemeines**

Sensitivität wird hier im Sinne von Testmittelpunkt C der vierparametrischen Gleichung von RODBARD gebraucht. Nachweisgrenzen im statistischen Sinne hängen sehr stark vom Geschick des einzelnen Experimentators ab. Diese handwerkliche Komponente kann nur unvollkommen wissenschaftlich beschrieben werden und wird hier deshalb nicht quantitativ diskutiert. Es soll damit keineswegs behauptet werden, daß wissenschaftliche Untersuchungen keinen Beitrag zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit oder Richtigkeit von Verfahren liefern könnten. Im Gegenteil, das tiefere Verständnis über die Vorgänge in einem Immunoassay kann sehr viel dazu beitragen, daß Testverfahren optimiert und problemlos durchgeführt werden können.

Bei Immunoassays ist es wichtig, sich vor der Entwicklung eines Tests Gedanken über die erforderliche Empfindlichkeit zu machen. Denn jede Zehnerpotenz niedrigere Nachweisgrenze kann erheblichen Aufwand erfordern. Diese Problematik wird dann besonders klar, wenn man bedenkt, daß Immunoassays routinemäßig in einem Konzentrationsbereich von mg/L bis pg/L eingesetzt werden. Die Anforderungen sind folglich sehr unterschiedlich.

#### **3.2 Verdünnungsreihen**

Diesen Abschnitt hätte man auch "Affinitätslimitierung" nennen können. Prinzipiell geht es um die Strategie, durch stärkeres Verdünnen des Tracers bzw. niedrigeren Antikörperkonzentrationen bei kompetitiven Immunoassays die Empfindlichkeit zu steigern.

Es ist offensichtlich, daß der Zusatz eines Tracers das Gleichgewicht zwischen Analyt und Antikörper stört. Und zwar geschieht dies grundsätzlich in der Richtung, die eine Ver-

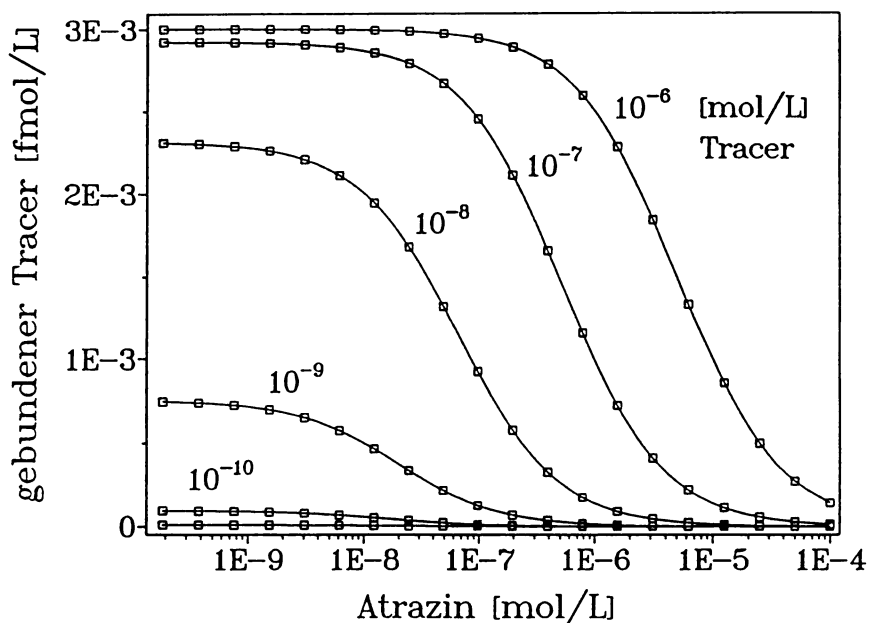
schlechterung der Empfindlichkeit nach sich zieht. Auch der Umkehrschluß ist in Grenzen erlaubt: So stört der Tracer das Gleichgewicht umso weniger, je weniger Tracer anwesend ist. Problematisch wird es ab dem Punkt, an dem man annimmt, die Empfindlichkeit ließe sich auf diese Weise beliebig steigern, hätte man nur einen hoch verdünnbaren (extrem sensitiv nachweisbaren) Tracer. Dies ist bei kompetitiven Immunoassays nicht der Fall. Man kann sich das z.B. so klar machen, daß ein Gleichgewicht durch sehr geringe Tracerkonzentrationen nur noch unmeßbar gestört wird. Verringert man nun die Tracerkonzentration weiter, so stört man das Gleichgewicht nur noch "unmeßbarer".

Dieser Effekt tritt bei unzähligen Immunoassays in unangenehmer Weise auf, in dem er viele Optimierungsversuche zum Scheitern bringt. So ist es lange bekannt, daß die Verwendung von prinzipiell z.B. 10-1000fach empfindlicher nachweisbaren Fluoreszenzsubstraten bei den meisten ELISAs nur eine Verbesserung zwischen dem Faktor 2 und 10 einbringen [35], wodurch sich der hohe Meßaufwand nur selten rechtfertigt. Sorgfältig durchgeführte Experimente bestätigen immer wieder, daß der Wechsel von z.B. chromogenen zu fluorogenen Substraten sogar identische Eichkurven ergeben kann [421][422].

Gelegentlich werden Ergebnisse publiziert, die Vorteile von fluorogenen Substraten aufzeigen sollen. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit [423] sind die Schwachstellen der Argumentation jedoch so offensichtlich, daß sie kurz erläutert werden sollen. Auch kommerzielle Motivationen könnten hier eine Rolle spielen: Die Autoren sind wohl nicht ganz zufällig beim Hersteller des empfohlenen fluorogenen Substrats beschäftigt. Interessanterweise haben sich die Autoren auch noch einen Hapten-Immunoassay für 2,4-Dinitrophenol ausgesucht, bei dem die Vorteile von empfindlichen Substraten aus Affinitätsgründen besonders wenig zum Tragen kommt. So werden zwei Eichkurven dargestellt, die mit unterschiedlichen Bedingungen erhalten wurden. Die Kurve des fluorogenen Substrats wurde mit einer Antigenverdünnung (immobilisiert) von 1:1000 gewonnen, die Kurve des chromogenen Substrats mit einer Verdünnung von 1:100, was aus den oben beschriebenen Gründen zu einer Empfindlichkeits-einbuße führt. Es wurde als Grund angegeben, die Absorption des chromogenen Substrats hätte bei einer Verdünnung von 1:1000 nicht ausgereicht. Nach den publizierten Daten wurde jedoch schon nach 4 min eine Absorption von ca. 0.7 gemessen (Verdünnung 1:100). Geht man näherungsweise von einem linearen Zusammenhang zwischen Absorption und Konjugat-Konzentration aus, so könnte man mit 40 min Entwicklungszeit (üblich sind bei AP 1-6 h) auch bei einer Verdünnung von 1:1000 eine Absorption von 0.7 erreichen. Damit wäre höchstwahrscheinlich jegliche Empfindlichkeitssteigerung hinfällig. Bestenfalls kann eine Verkürzung der Entwicklungszeit positiv verbucht werden, die jedoch durch die aufwendigere Handhabung und Messung bei fluorogenen Substraten stark relativiert wird.

Da man nur selten den direkten Nachweis erbringen kann, daß "Verbesserungen" z.B. durch eine fehlerhafte Interpretation nicht signifikanter Ergebnisse entstanden sind, ist es interessant, Verdünnungsreihen in einem großen Konzentrationsbereich durch Computersimulation zu untersuchen.

In Abb. 87 werden simulierte Eichkurven bei variiertem Tracerkonzentration dargestellt. Bei hohen Tracerkonzentrationen tritt der erhoffte Effekt auf: Die Empfindlichkeit nimmt zu. Bei einer Tracerkonzentration von  $\ll 10^{-8}$  mol/L sinkt das Signal jedoch sehr schnell ab, was die Nachweisgrenze beeinträchtigt.



**Abb. 87: Verdünnungsreihe Tracer (Eichkurven-Simulation).** Gesamtdauer: 18 min, Zeitinkrement: 0.025 s,  $[Y]_0 = 10^{-14}$  mol/L, Tracer:  $k_1 = 10^7$  L/mol·s,  $k_{-1} = 10^{-2}$  1/s, Analyt:  $k_2 = 10^7$  L/mol·s,  $k_{-2} = 10^{-1}$  1/s, Analytzugabe  $t = 1$  min, Tracerzugabe  $t = 6$  min, Waschen  $t = 16$  min bis  $t = 18$  min. Volumen: Analyt 200  $\mu$ L, Tracer 100  $\mu$ L.

Noch besser erkennt man den affinitätslimitierten Bereich, wenn man den Testmittelpunkt gegen die Tracerkonzentration aufträgt (Abb. 88). Hier entspricht der "Knick" der Kurve dem Übergang vom konzentrations- zum affinitätslimitierten Bereich. Es ist gut erkennbar, daß ab  $10^{-10}$  mol/L auch Tracerverdünnungen um den Faktor 1000 (oder mehr) keinen sichtbaren Effekt auf den Testmittelpunkt haben. Man erkennt auch, daß der minimale Testmittelpunkt in der Nähe von  $1/K$  liegt. Die Gleichgewichtskonstante war hier zu  $10^8$  L/mol gewählt worden. Die geringe Abweichung von  $10^{-8}$  ist auf die noch notwendige Volumenkorrektur zurückzuführen. Auch aus den Überlegungen zur Messung der Gleichgewichtskonstante kann man schlußfolgern, daß der (korrigierte) Testmittelpunkt nie den Kehrwert der Affinitätskonstante unterschreiten kann. Katalysatoren können bekanntlich Geschwindigkeitskonstanten beeinflussen, die thermodynamisch definierte Gleichgewichtskonstante kann jedoch nicht verändert werden. Deshalb ist es unter den gegebenen Randbedingungen nicht möglich, das Gleichgewicht in die gewünschte Richtung zu verschieben.

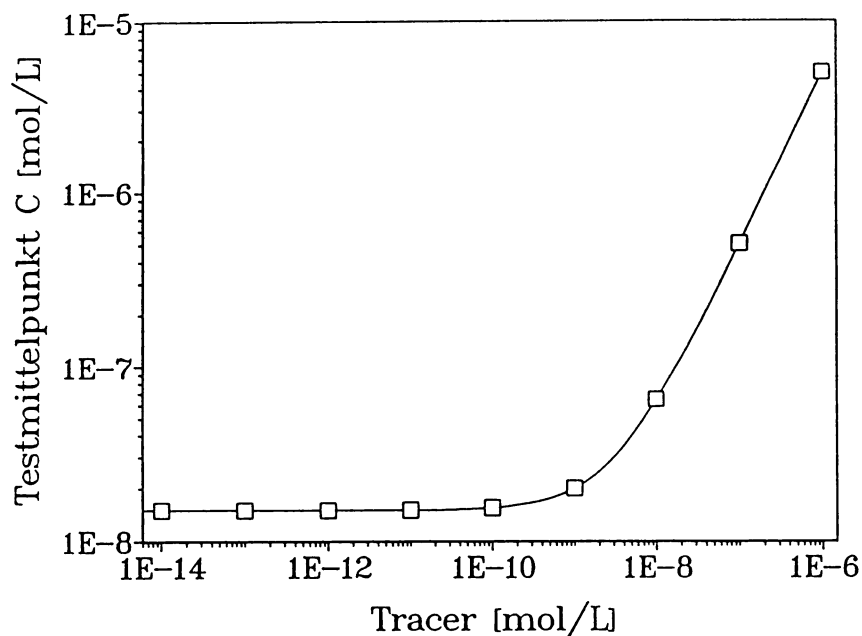


Abb. 88: Verdünnungsreihe Tracer, Testmittelpunkt (Simulation). (Bedingungen siehe Abb. 87)

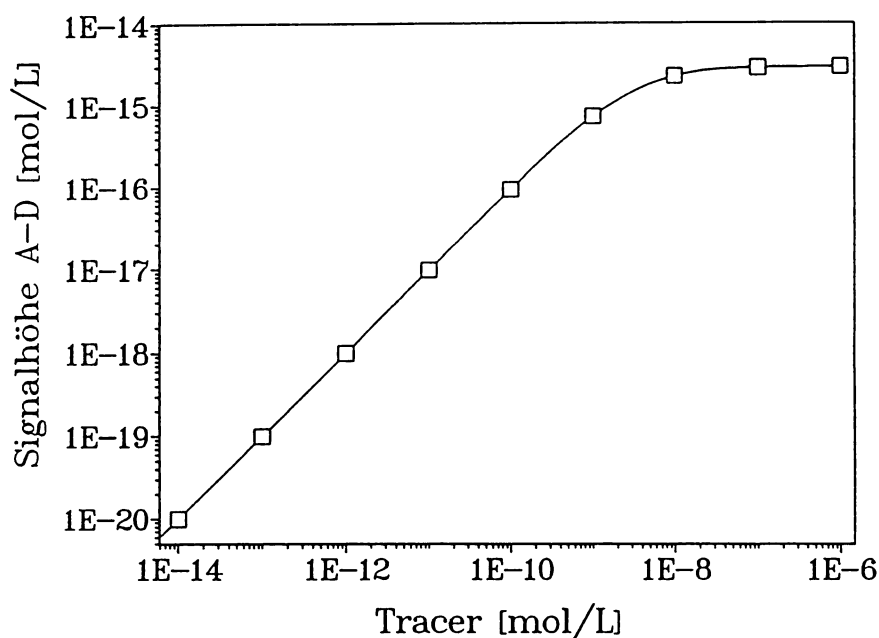


Abb. 89: Verdünnungsreihe Tracer, Signalhöhe (Simulation). (Bedingungen siehe Abb. 87)

Es ist nicht einmal so, daß sich extreme Tracerverdünnungen "testneutral" verhalten. In Abb. 89 erkennt man, daß gleichfalls am Übergang des Konzentrations- zum Affinitätslimitierten Bereich eine deutliche Veränderung des Verhaltens bezüglich der Signalthöhe auftritt. So muß man im Affinitätslimitierten Bereich durch eine Verdünnung des Tracers um den Faktor 10 eine Signaleinbuße um den Faktor 10 hinnehmen. Da dies nicht mit einer Steigerung der

Empfindlichkeit einher geht, sind Verdünnungen in diesem Bereich völlig kontraproduktiv. Die Kurve in Abb. 89 zeigt auch, daß es ein ganz einfaches Indiz zur Erkennung von Affinitätslimitierungen gibt: Beginnt das Signal bei der Verdünnung des Tracers stark abzusinken (linear im Log/Log-Plot), so hat man den affinitätslimitierten Bereich erreicht. Jede weitere Optimierung an diesem Antikörper ist dann überflüssig.

Analoge Überlegungen lassen sich im Bezug auf die Antikörper-Konzentration anstellen. Hier ist es aber nicht die Störung des Vergleichgewichts, das die "Affinitätslimitierung" definiert. Der Antikörper ist ja von vorneherein integraler Teil des Vergleichgewichts. Es gilt jedoch im Vergleichgewicht mit  $x$  als Reaktionslaufzahl:

$$K = \frac{[AY]}{[A][Y]} = \frac{x}{([A_0]-x)([Y_0]-x)}$$

Bei niedrigen Konzentrationen ist  $x$  klein (geringer Umsatz) und es gelten die Randbedingungen:

$$x < [Y]_0 \quad \text{und} \quad x < [A]_0 \quad (\text{Gl. 52})$$

Daraus leitet sich folgender vereinfachter Zusammenhang ab:

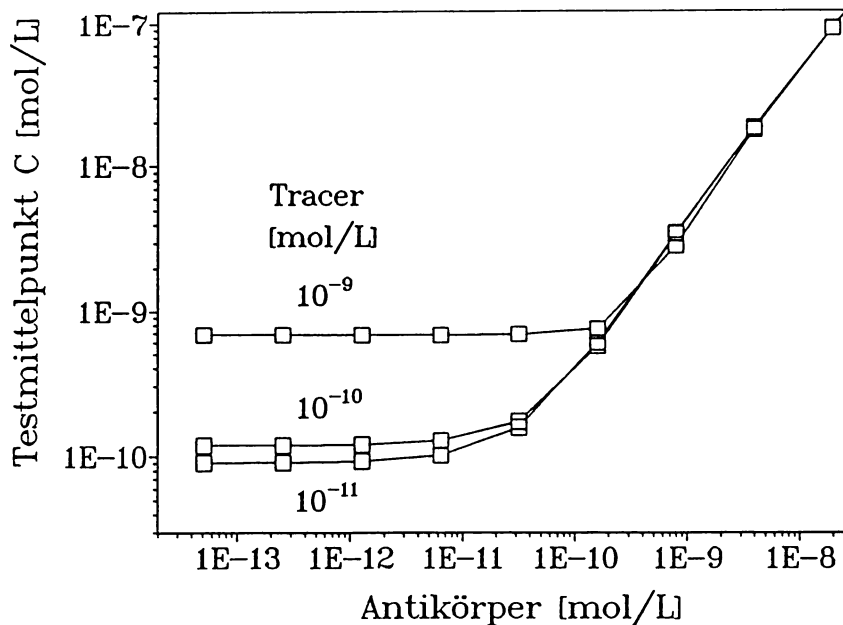
$$K = \frac{x}{([A_0]-x)([Y_0]-x)} \approx \frac{x}{[A_0][Y_0]} \quad (\text{Gl. 53})$$

Da bei einem Immunoassay das Verhältnis der besetzten zu den insgesamt verfügbaren Bindungsstellen interessiert, formuliert man den Quotienten

$$\text{Anteil}_{\text{besetzt}} = \frac{x}{[Y_0]} = K[A_0] \quad (\text{Gl. 54})$$

Das bedeutet, daß bei niedrigen Konzentrationen der Anteil der besetzten Bindungsstellen unabhängig von der Konzentration der Antikörper wird. Auch bei Antikörperverdünnungsreihen ist also das Auftreten einer affinitätslimitierten Region zu erwarten.

Ein möglicher Einwand gegen die obige Herleitung könnten die gemachten Randbedingungen sein. Daher wurde zusätzlich eine Simulation ohne obige einschränkende Annahmen durchgeführt (Abb. 90). Es zeigt sich eindeutig, daß die obigen Annahmen gültig waren. Bei niedrigen Antikörper-Konzentrationen ergibt sich ein konstanter Testmittelpunkt. Zu hohen Antikörperkonzentrationen steigt der 50%-Wert proportional an. An Abb. 90 ist auch sehr anschaulich zu erkennen, welchen Einfluß die Tracerkonzentration hat. Es muß eine so niedrige Konzentration verwendet werden, daß keine nennenswerte Störung des Vergleichgewichts eintritt. Gleichfalls ist gut zu sehen, daß eine weitere Absenkung der Tracerkonzentration keine sinnvolle Maßnahme darstellt, da der Testmittelpunkt sich asymptotisch einem Grenzwert annähert.



**Abb. 90: Verdünnungsreihe Antikörper (Simulation).** Testmittelpunkt gegen Antikörperkonzentration. Gesamtdauer: 18 min, Zeitinkrement: 0.025 s, Tracer:  $k_1=4 \cdot 10^7$  L/mol·s,  $k_{-1}=4 \cdot 10^{-4}$  1/s, Analyt:  $k_2=8 \cdot 10^7$  L/mol·s,  $k_{-2}=5 \cdot 10^{-3}$  1/s, Analytzugabe  $t=1$  min, Tracerzugabe  $t=6$  min, Waschen  $t=16$  min bis  $t=18$  min. Volumen: Analyt 200  $\mu$ L, Tracer 100  $\mu$ L.

### 3.3 Inkubationszeiten

Neben den Autoren, die kinetische Effekte weitgehend ignorieren, gibt es doch einige, die sich mit dem Einfluß der Inkubationszeit auf Immunoassays beschäftigt haben [424]. Interessanterweise sind die Resultate und die daraus abgeleiteten Empfehlungen ziemlich heterogen. So empfehlen VINING et al. [425] Gleichgewichtsbedingungen, da Kurzinkubation zu einem Ansteigen der Kreuzreaktionen führe. Da sich die Assoziationskonstanten nur unwesentlich unterscheiden, liege die ganze Differenzierung (Selektivität) in der Dissoziationskonstante. Es wird ausdrücklich davor gewarnt, sequentielle Inkubationsmodelle zu verwenden. Dagegen zeigen RODBARD et al. [426] in einer Simulationsstudie die erheblichen Sensitivitätsvorteile auf, die durch verspätete Zugabe des markierten Liganden möglich sind.

Die Übersichtsartikel von ZETTNER geben einen guten Vergleich zwischen den prinzipiellen Unterschieden von Gleichgewichtsimmoassays ("Equilibrium Saturation") [49] und Nichtgleichgewichtsimmoassays ("Sequential Saturation") [427] und deren theoretische Behandlung.

PRATT und WOLDRING [428] münzten den Begriff des "First-come, first-served"-Effekt, der die Selektivitätsnachteile eines sequentiellen Immunoassays umschreibt. BACHAS und

MEYERHOFF [412] stützen diese Hypothese mit theoretischen Überlegungen. Die Autoren folgern, daß sequentielle Immunoassays "weitgehend nichtselektiv"<sup>18</sup> seien.

In dieser Arbeit wurden sowohl polyklonale, als auch monoklonale Antikörper auf ihr Verhalten gegenüber variiert Tracerinkubationszeit untersucht [285]. Die Variation der Vorinkubationszeit stößt auf einige technische Probleme, so daß zumindest bei Hapten-Immunoassays diese Variationsmöglichkeit meist verschlossen bleiben dürfte. Zudem konnte gezeigt werden, daß sich das Antikörper/Analyt-Gleichgewicht sehr schnell einstellt und daher die Vorinkubation unter den hier gewählten Bedingungen keinen nennenswerten Einfluß hat (siehe S. 112).

In Abb. 91 ist der Einfluß einer Verkürzung der Tracerinkubationszeit dargestellt. Es ist offensichtlich, daß eine kurze Tracerinkubationszeit eine Verbesserung der Empfindlichkeit des Tests zur Folge hat. Nachteile im Bereich Reproduzierbarkeit (siehe Fehlerbalken) sind nicht zu erkennen.

Die enorme Ausweitung des Meßbereichs ist in Abb. 92 dargestellt. Eine Tracerinkubation zwischen 1 min und 40 h ermöglicht es, ohne jede weitere Manipulation des Tests eine Gesamt-Meßbereich von 5 Dekaden (2 ng/L-200 µg/L) zu erreichen. Der Testmittelpunkt läßt sich um den Faktor 600 verschieben.

Es stellt sich nun die Frage, ob dieses Verfahren bei jedem Antikörper angewandt werden kann, oder ob z.B. monoklonale Antikörper keine Verschiebungen zeigen. Zur Klärung dieser Frage wurden noch weitere polyklonale und zwei monoklonale Antikörper untersucht.

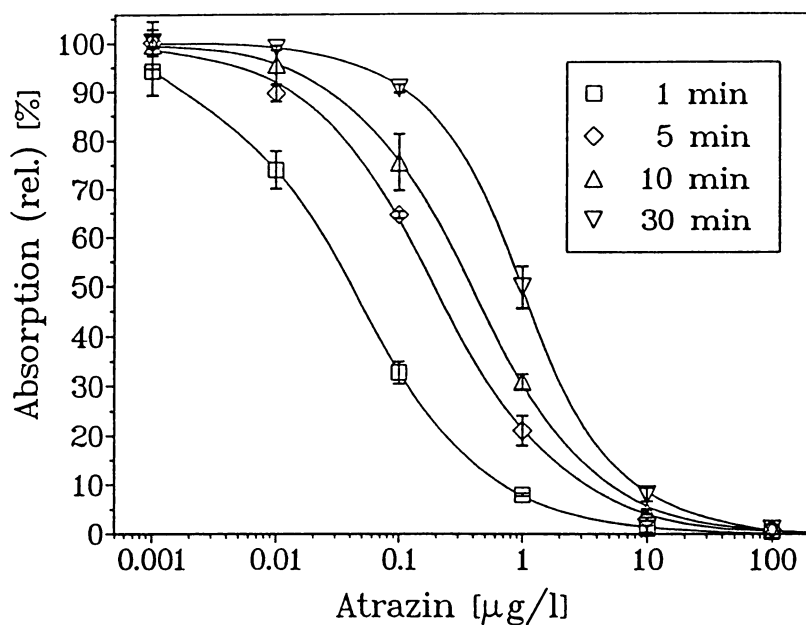
Der in Analogie zu C193 (Kaninchen) hergestellte Schaf-Antikörper S84 zeigt gleichfalls eine ausgeprägte Zeitabhängigkeit (Abb. 93). Es scheint sich also nicht um ein isoliertes Phänomen eines einzigen Antikörpers zu handeln. Auch monoklonale Antikörper wie K1F4 (Abb. 94) und Ciba 21-1 (Abb. 95) zeigten eine signifikante Verbesserung des Testmittelpunkts bei kurzen Inkubationszeiten. Hier ist jedoch zu bemerken, daß der Effekt bei monoklonalen Antikörpern wesentlich geringer ausgeprägt war und nur bei hohen Tracerkonzentrationen beobachtet werden konnte.

Ausgehend von diesen Beobachtungen lassen sich mindestens drei mögliche Mechanismen postulieren. Zunächst kann es sich um einen Effekt handeln, der durch die Verdrängung von Analyt durch den Tracer verursacht wird. Da der Tracer in der Regel besser gebunden wird als der Analyt, bindet langfristig immer mehr Tracer. Dieser Weg ins Gleichgewicht dürfte grundsätzlich von einem Empfindlichkeitsverlust begleitet werden. Dieser Mechanismus scheint bei den untersuchten monoklonalen Antikörpern vorzuherrschen und sollte stark von der Tracer-Konzentration und der Tracer-Affinität abhängen.

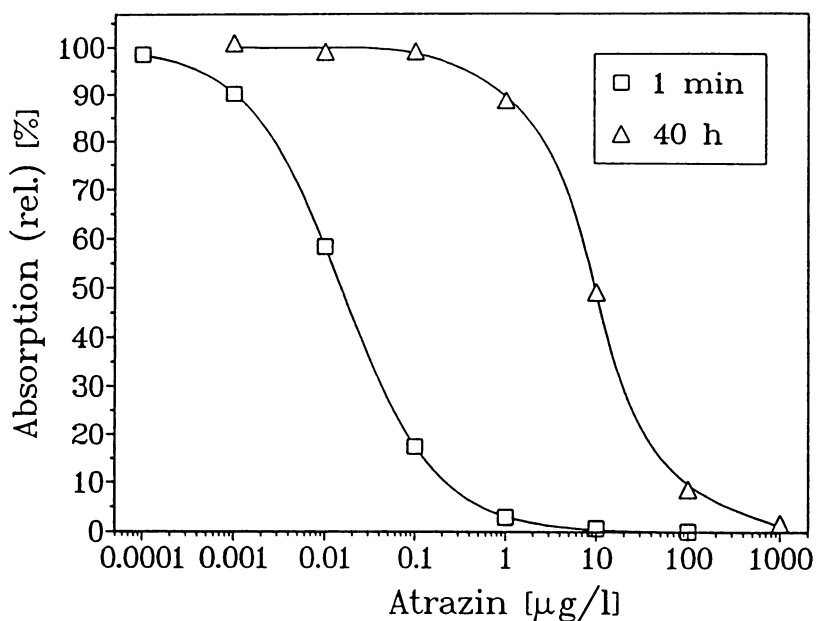
---

<sup>18</sup> "Unfortunately, it is also shown, that such sequential binding approaches render the assays essentially nonselective."

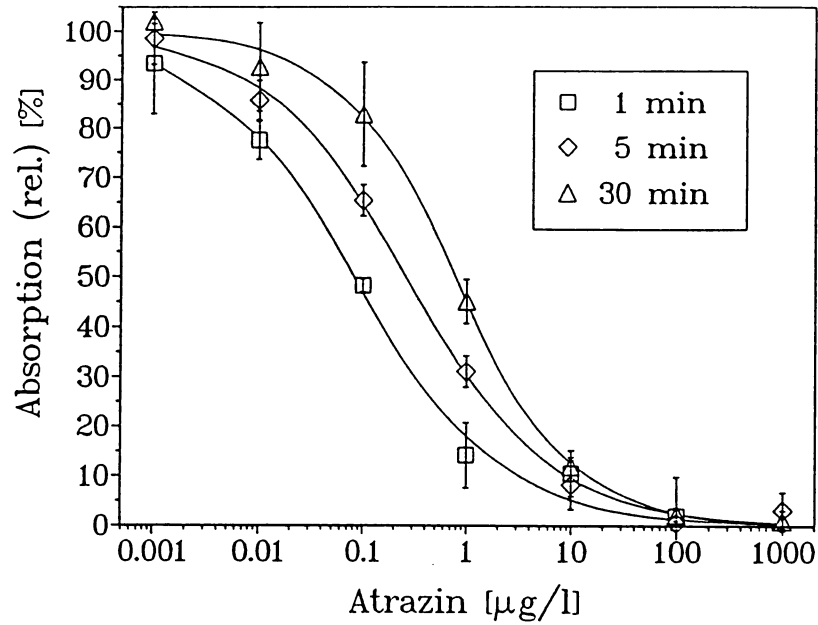




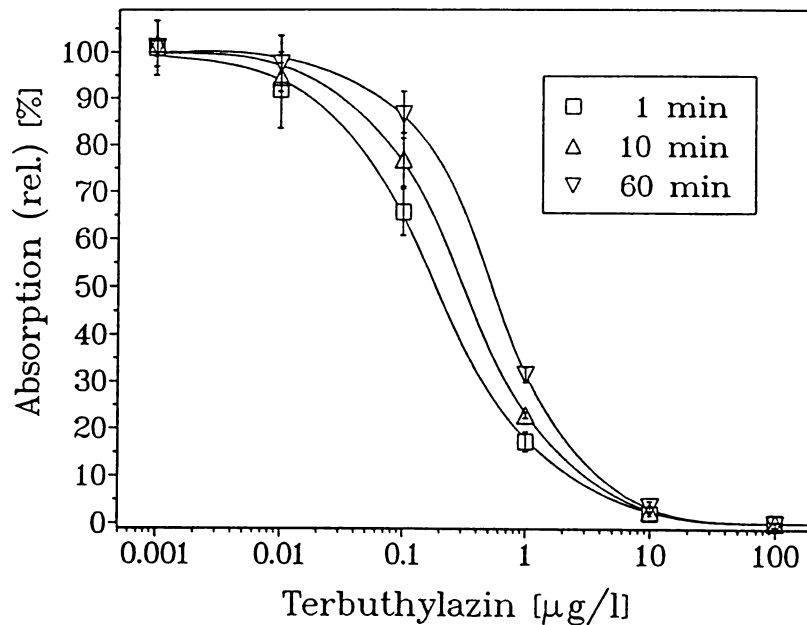
**Abb. 91: Variation der Tracerinkubationszeit: polyklonaler Antikörper C193.** Antikörper: C193 1:20.000, 200  $\mu\text{L}$ , 48 h, RT, Vorinkubation (Atrazin-Eichlösungen, Wasser) 200  $\mu\text{L}$ , 60 min, Tracer: *i-Pr/Cl/C6* 1:20.000, 100  $\mu\text{L}$ , Zeit s.o., Entwicklung: 30 min, Meßpunkte: Median von Dreifachbestimmung ( $n=3$ ), Fehlerbalken: Spannweite (siehe Glossar).



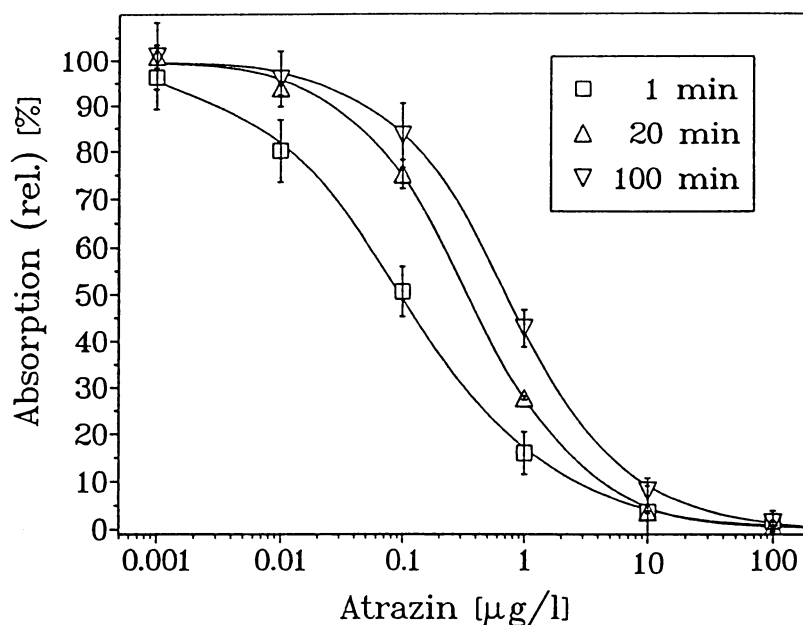
**Abb. 92: Variation der Tracerinkubationszeit (C193): Maximale Veränderung.** Antikörper: C193 1:20.000, 200  $\mu\text{L}$ , 48 h, RT, Vorinkubation (Atrazin-Eichlösungen, Wasser) 200  $\mu\text{L}$ , 3 h, Tracer: *i-Pr/Cl/C6* 1:20.000 (PBS + 100 mg/L BSA), 100  $\mu\text{L}$ , 1 min bzw. 40 h, Entwicklung: 35 min, ( $n=1$ ).



**Abb. 93: Variation der Tracerinkubationszeit: Polyklonaler Antikörper S84.** Antikörper: S84 1:20.000, 200  $\mu\text{L}$ , 24 h, RT, Vorinkubation (Atrazin-Eichlösungen, Wasser) 200  $\mu\text{L}$ , 150 min, Tracer: *i*-Pr/Cl/C6 1:20.000 (PBS), 100  $\mu\text{L}$ , Zeit s.o., Entwicklung 30 min, ( $n=3$ ).



**Abb. 94: Variation der Tracerinkubationszeit: Monoklonaler Antikörper KIF4.** Antikörper: KIF4 1:20.000, 200  $\mu\text{L}$ , ca. 18 h, RT, Vorinkubation (Terbutylazin-Eichlösungen, Wasser) 200  $\mu\text{L}$ , 180 min, Tracer: *t*-Bu/Et/C6 1:5.000 (PBS), 100  $\mu\text{L}$ , Zeit s.o., Entwicklung 30 min, ( $n=3$ ).

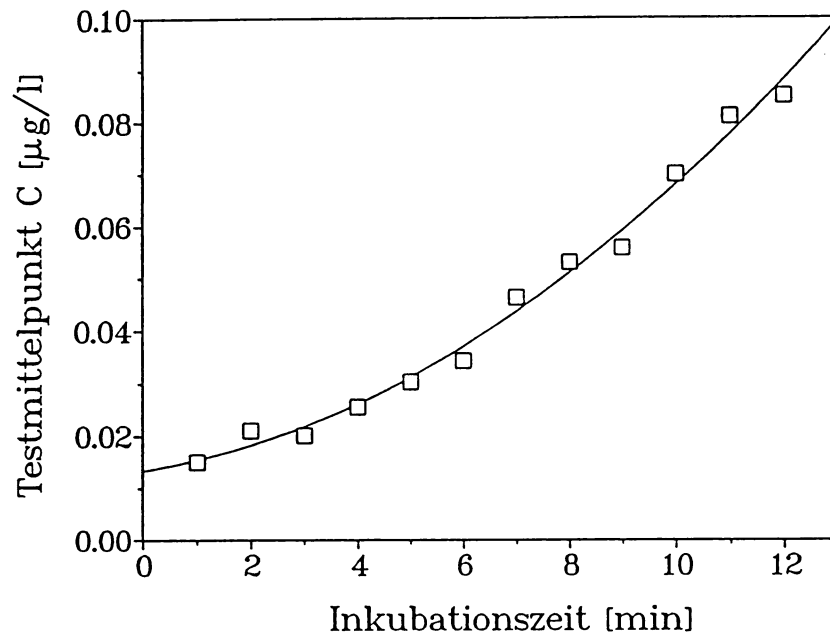


**Abb. 95: Variation der Tracerinkubationszeit: Monoklonaler Antikörper Ciba 21-1.** Antikörper: Ciba 21-1 1:10.000, 200  $\mu\text{L}$ , 5 h, RT, Vorinkubation (Atrazin-Eichlösungen, Wasser) 200  $\mu\text{L}$ , 60 min, Tracer: *i-Pr/Cl/C6* 1:5.000 (PBS + 1 g/L BSA), 100  $\mu\text{L}$ , Zeit s.o., Entwicklung 30 min, 15 min, 5 min, ( $n=3$ ).

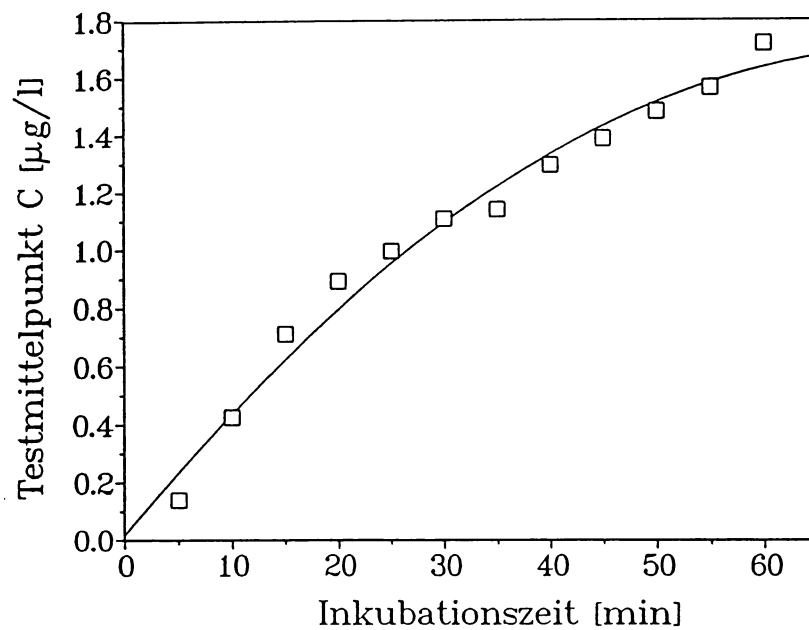
Der zweite Mechanismus bezieht sich nicht auf den Tracer, sondern auf den Analyten. Durch den Vorinkubationsschritt wird ein Vorgleichgewicht eingestellt. Im Moment der Tracerzugabe wird dieses Gleichgewicht auch durch Verdünnung gestört. Unabhängig von Art und Konzentration des Tracers beginnt das Hapten teilweise abzu dissoziieren um sich dem neuen Gleichgewicht anzunähern. Dieser Verdünnungsfaktor kann je nach Testdesign typischerweise 0.25-0.75 ausmachen. Bei einem schnellen Test (relativ zur der Dissoziationskonstante des Haptens  $k_{-2}$ ) kann ein Teil dieses Faktors genutzt werden, bei einem langsamen Test geht dieser potentielle Empfindlichkeitsgewinn verloren. Dieser Mechanismus kann nur zusätzlich, aber nicht ausschließlich für die gefundenen Zeitabhängigkeiten verantwortlich sein, da die Größenordnung der potentiellen Veränderung zu klein und bei den untersuchten Antikörpern nur bei sehr kurzen Zeiten zu erwarten ist.

Der dritte Mechanismus könnte sich auf die Polyklonalität von Antiseren beziehen. Binden niedrigaffine Antikörper Tracermoleküle nicht lange genug, um eine gute Adsorption an der Platte zu erreichen, so haben die hochaffinen Antikörper anfangs einen Vorsprung. Sie würden den Testmittelpunkt bestimmen. Später jedoch würde die schwache Bindung des Tracers zur Bindung an der Platte ausreichen. Auf diese Weise würden andere, häufigere Antikörperfraktionen mit geringeren Affinitätskonstanten die Oberhand gewinnen. Dies hätte eine kontinuierliche Verschiebung des Testmittelpunkts zur Folge, wie sie auch beobachtet wird. Dieser Mechanismus wäre relativ langsam und würde nur bei polyklonalen Antikörpern auftreten können. Dies steht in gutem Einklang mit den Experimenten. Um die quantitativen

Verhältnisse besser zu erkennen, wurden Tests in unterschiedlichen Zeitfenstern der Tracerinkubation durchvariiert.



**Abb. 96:** Veränderung des Testmittelpunkts  $C$  durch Variation der Tracerinkubationszeit (C193), kurze Zeiten. Antikörper: C193 1:20.000, 200  $\mu\text{L}$ , ca. 18 h, RT, Vorinkubation (Atrazin-Eichlösungen, Wasser) 200  $\mu\text{L}$ , 60 min, Tracer:  $i\text{-Pr/Cl/C6}$  1:20.000 (PBS + 4 g/L BSA), 100  $\mu\text{L}$ , Zeit s.o., Entwicklung 10 min ( $n=1$ ).

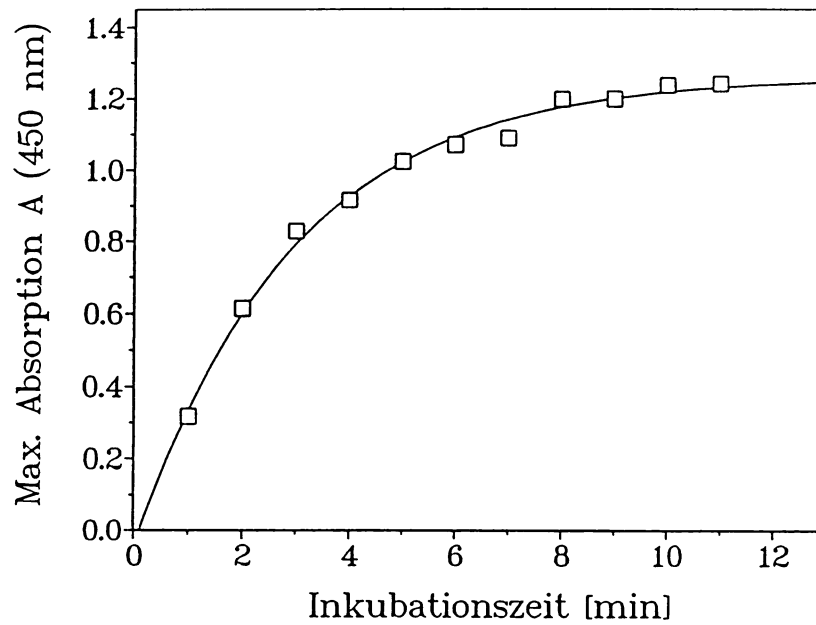


**Abb. 97:** Veränderung des Testmittelpunkts  $C$  durch Variation der Tracerinkubationszeit (C193), lange Zeiten. Antikörper: C193 1:20.000, 200  $\mu\text{L}$ , ca. 18 h, RT, Vorinkubation (Atrazin-Eichlösungen, Wasser) 200  $\mu\text{L}$ , 60 min, Tracer:  $i\text{-Pr/Cl/C6}$  1:20.000 (PBS + 4 g/L BSA), 100  $\mu\text{L}$ , Zeit s.o., Entwicklung 15 min ( $n=1$ ).

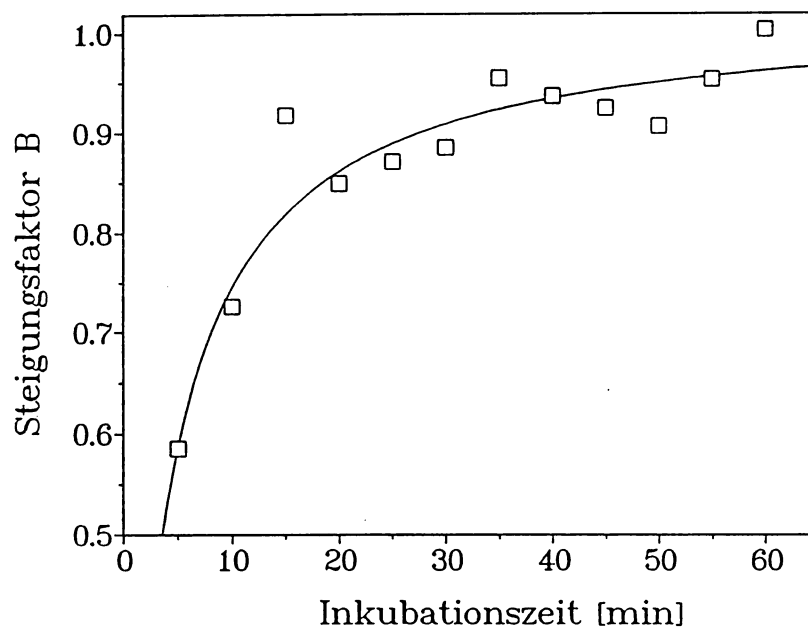
In Abb. 96 wird das Verhalten des Antikörpers C193 in einem Zeitfenster von 1 bis 12 min gezeigt. Es scheint sich um einen asymptotischen Verlauf zu handeln, der auch leicht erklärbar ist. Unabhängig von genauen Mechanismus der Verschiebung kann der Testmittelpunkt kaum unter den Wert sinken, der dem Vergleichsgewicht entspricht. Dies dürfte dem asymptotisch annäherbaren Wert entsprechen. Bei einem Zeitfenster von 5 bis 60 min (Abb. 97) wird eine andere Tendenz sichtbar: Es scheint auch eine obere Asymptote zu existieren. Dies könnte mit dem nach unendlicher Zeit erreichten Gleichgewicht der Gesamtmischung korrespondieren. Höher sollte der Testmittelpunkt nicht ansteigen können.

Die Verkürzung der Tracerinkubationszeit hat selbstverständlich seine Grenzen. Insbesondere die Abnahme des Signals (maximale Absorption A) kann limitierend wirken. In Abb. 98 ist diese Abnahme exemplarisch aufgetragen. Man kann jedoch erkennen, daß es einen Bereich geringer Signal-Abnahme gibt, den man folglich ohne nennenswerte Einbußen ausschöpfen kann. Erst bei sehr kurzen Zeiten (bei denen der Testmittelpunkt nicht mehr signifikant absinkt) geht das Signal stark zurück. Es erscheint nicht sinnvoll, diesen Bereich zu nutzen.

Schwierig zu erklären, aber doch einer Erwähnung wert, ist die Beobachtung, daß die Steigung durch Kurzinkubation beeinflusst werden kann (Abb. 99). So liegt der Steigungsfaktor B bei normalen Inkubationszeiten ungefähr bei 1. Bei Tracerinkubationszeiten  $< 10$  min geht B deutlich zurück. Diese flacheren Eichkurven können zu einem zusätzlichen Empfindlichkeitsgewinn führen, da bei identischen Testmittelpunkten der signifikant von Nullwert unterscheidbare Bereich bei niedrigeren Konzentrationen liegt. Einen Hinweis zur Erklärung geben Computersimulationen (Daten nicht dargestellt). So tritt unter bestimmten Bedingungen ein Wechsel der Limitierungen auf. Bei hohen Analytkonzentrationen ist die Affinitätskonstante (fast gleichbedeutend mit der Dissoziationskonstante) limitierend. Bei niedrigen Analytkonzentrationen wird die Assoziation des Analyten begrenzend. Im Übergangsbereich treten mehr oder weniger ausgeprägt zwei Wendepunkte auf. Wenn man Meßfehler mit einrechnet, so wird in der Praxis eine Eichkurve mit einer geringen Steigung erhalten. Dieses Phänomen wird natürlich bei Annäherung an Quasi-Gleichgewichtsbedingungen immer schwächer. Das bedeutet, daß bei langen Inkubationszeiten übliche, bei kurzen jedoch niedrigere Steigungen beobachtet werden.



**Abb. 98** Veränderung der max. Absorption A durch Variation der Tracerinkubationszeit (C193), kurze Zeiten. (Bedingungen siehe Abb. 96)



**Abb. 99:** Veränderung des Steigungsfaktors B durch Variation der Tracerinkubationszeit (C193), lange Zeiten. (Bedingungen siehe Abb. 97)

### 3.4 Die Verwendung des richtigen Antikörpers

In vielen Experimenten konnte gezeigt werden, wie unerbittlich die Affinitätskonstante des Antikörpers die Nachweisgrenze des Tests bestimmt. So konnte durch Optimierungsverfahren aller Art nur die durch diese vorgegebene Konstante bestimmte Grenze ausgeschöpft, aber nicht durchbrochen werden. Ein Antikörper mit niedrigen Bindungskonstanten wird bei aller Mühe keinen empfindlichen Test ergeben. Nun stellt sich insbesondere bei Haptene die prinzipielle Frage, wie hoch eine nicht-kovalente Bindung zwischen Hapten und "Komplexbildner" maximal sein kann. Einen guten Anhaltspunkt liefert die bekannte Biotin-Avidin-Reaktion. Obwohl es nicht garantiert ist, daß von Antikörpern jemals vergleichbare Affinitätskonstanten realisiert werden können, ist es doch interessant, was mit einem Protein in der Natur schon verwirklicht wurde. Biotin besitzt eine Molmasse von 244.32, einen  $pK_a$  von ca. 3.5 und molekulare Dimensionen von  $10.2 \times 5.5 \text{ \AA}$ , die aus einer energieminierten ALCHEMY-Struktur [429] ermittelt wurden.

Vergleicht man die Werte des Biotin/Avidin-Systems (siehe S. 141) mit den in dieser Arbeit bestimmten thermodynamischen und kinetischen Konstanten, so zeigen sich interessante Unterschiede. Untersucht man Atrazin/Antikörper-Komplexe, so bleibt ein Faktor 60.000-70.000 zum Biotin-Avidin-System, sowohl bezogen auf die Gleichgewichts- als auch die Dissoziationskonstante. Nimmt man für den Vergleich die Carbonsäure i-Pr/Cl/C6 (Molmasse 301.7), so vermindert sich der Abstand um den Faktor 10. Die Schlußfolgerung liegt nahe: Von der reinen Wechselwirkung aus gesehen ist eine theoretische Steigerung der Gleichgewichtskonstanten um mindestens den Faktor 5000 möglich. Dies würde einer Nachweisgrenze von  $< 0.1 \text{ pg/L}$  entsprechen.

Die Herstellung bzw. die Auswahl des Antikörpers in Bezug auf Sensitivität und Selektivität wurde an anderer Stellen dieser Arbeit ausführlich beschrieben.

Die Robustheit eines Antikörpers scheint in der Praxis von wachsender Bedeutung. Da sich die Anwendungsbereiche von immunologischen Methoden laufend ausweiten, werden Antikörper auch in Medien eingesetzt, an die früher nicht gedacht wurde. Dies stellt natürlich extreme Anforderungen an die Denaturierungsresistenz eines Antikörpers. Zwar ist es in Einzelfällen schon gelungen, Antikörper durch spezielle Immobilisierungs- und Vernetzungstechniken zu stabilisieren, im Normalfall ist jedoch eher die Suche nach von Natur aus robusten Antikörpern vorzuziehen.

Die Reinheit einer Antikörperpräparation, ob monoklonal oder polyklonal, ist ein weiterer wichtiger Faktor. Sie entscheidet unter anderem, ob mit einem Antikörper direkt eine Mikrotiterplatte beschichtet werden kann. Andernfalls muß die etwas aufwendigere Doppelantikörpertechnik angewandt werden, bei der die Platten zuerst mit z.B. anti-Maus-IgG-Seren gecoatet werden. Der Einfachheit (Anwendung) halber mag man daher der höchsten Reinheit den Vorzug geben. Andererseits gibt es einige Hinweise, daß hochgereinigte Antikörper

relativ instabil sind und schnell an Aktivität verlieren können. Die anderen Serumproteine scheinen hier einen Schutz zu bewirken.

### 3.5 Die Verwendung des richtigen Tracers

Die Publikationen zum Thema Tracer im Immunoassay sind Legion. Trotzdem scheint die Auswahl eines Tracers noch häufig dem Zufall überlassen zu werden. In dieser Arbeit konnte an verschiedenen Systemen gezeigt werden (z.B. Abb. 44), daß bei monoklonalen Antikörpern die Empfindlichkeit durch Variation des Tracers nicht nennenswert verändert werden kann. Voraussetzung ist aber ein ausreichend gut bindender Tracer, daß ein gut meßbares Signal erhalten wird. Sensitivität und sehr wahrscheinlich auch Selektivität werden bei monoklonalen Antikörpern weitgehendst vom Antikörper bestimmt.

Völlig anders ist dagegen die Situation bei polyklonalen Antikörpern. Hier hat der Tracer die wichtige Funktion der Selektion der richtigen Antikörper-Fraktion. Je nach Tracerstruktur können dann aus einem Serum im Extremfall mehrere nützliche Immunoassays mit unterschiedlicher Sensitivität und Selektivität aufgebaut werden. Es ist sogar denkbar, aus einem Serum verschiedene Immunoassays gegen völlig unterschiedliche Substanzen herzustellen. Die Selektivität muß der Tracer leisten. Daraus folgt auch die experimentell gut untermauerte Forderung, daß Tracer für polyklonale Antikörper extrem hohen Reinheitsanforderungen genügen müssen. Denn existiert in dem verwendeten Serum auch nur eine Spur eines (hochaffinen) Antikörpers gegen eine an den Tracer konjugierte Verunreinigung, so wird die Funktionsfähigkeit des gesamten Tests in Frage gestellt.

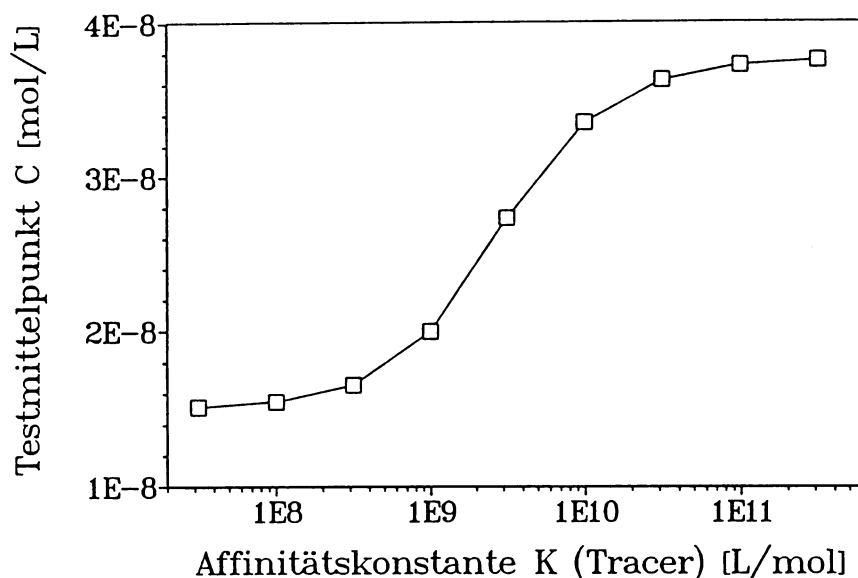
Folglich ist bei polyklonalen Antikörpern die Traceroptimierung und Reinigung ein entscheidender Schritt der Testentwicklung. Das sog. Heterologie-Prinzip basiert vermutlich auf der Selektion unterschiedlicher Antikörperfraktionen, die besser, manchmal auch schlechter sein können, als die ursprünglich verwendete. Zudem ist bei heterologen Tracern die Wahrscheinlichkeit geringer, daß bei der Immunisierung anwesende Verunreinigungen auch im Tracer vorhanden sind.

Häufig wird die Theorie vertreten, der Tracer würde durch seine starke Bindung die Testempfindlichkeit vermindern. Daher wird die Verwendung von schwach bindenden Tracern angestrebt. Die erstere Überlegung ist natürlich richtig, da durch hochaffine Tracer das Gleichgewicht stark gestört wird. Die Tatsache, daß auch stark bindende Tracer empfindliche ELISAs ergeben können, hat diese Argumentationskette jedoch in Frage gestellt. Es konnten Anhänger der gegensätzlichen Ansichten jeweils Beispiele für die Richtigkeit ihrer Meinung vorbringen. In dieser Arbeit können keine eindeutigen Hinweise für die Richtigkeit der Theorie der schwach bindenden Tracer präsentiert werden. Da jedoch die kinetischen und thermodynamischen Daten bezüglich Enzymtracer eher vage sind, kann folglich auch der Zusammenhang zwischen Affinitätskonstante des Tracers und Empfindlichkeit des Tests nur unscharf erkannt werden.

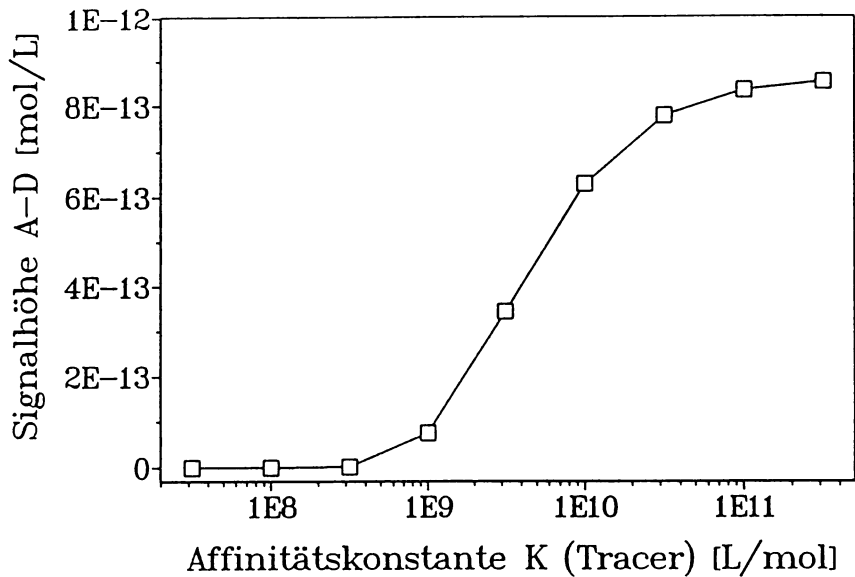


Daher ist es vorteilhaft, eine Computersimulation zu Rate zu ziehen. Es zeigte sich, daß beide Ansichten ihre Berechtigung haben. Für die Simulation wurde die Assoziationskonstante des Tracers festgehalten, was angesichts der identischen Größe der Tracer-Derivate sicherlich gerechtfertigt ist und auch durch diverse Literaturdaten gestützt wird. Die Variation der Gleichgewichtskonstante des Tracers wurde durch Veränderung der Dissoziationskonstante erzeugt. Im ersten Experiment (Abb. 100) wurden Tracer identischer Konzentration aber unterschiedlicher Gleichgewichtskonstante verglichen. Die Auftragung Testmittelpunkt gegen Affinitätskonstante des Tracers zeigt die erwartete Kurvenform: Tracer niedriger Affinität ergeben empfindlichere Eichkurven, als Tracer mit hoher Affinität. Der Unterschied ist zwar nicht groß, aber durchaus relevant für die Praxis. Zumindest scheint die Theorie der schwach bindenden Tracer hiermit eine Bestätigung erfahren zu haben. Betrachtet man nun aber Abb. 101, in der die Signalhöhe aufgetragen wurde, so bekommt das schöne Bild einen Schatten: Die Verbesserung des Testmittelpunkts wird nicht nur mit einer proportionalen Einbuße an Signal erkauft, ab einer kritischen Affinitätskonstante sinkt die Signalhöhe auf quasi Null ab.

Da in den bisher publizierten Simulationen die Waschschritte (Dissoziation von Komplexen) ausgeklammert wurden, konnten derartige Effekte nicht beobachtet werden. Der Abbruch des Signals wird tatsächlich von der Dissoziation während des Waschvorganges verursacht (Konzentration-Zeit-Diagramm nicht dargestellt). Die fast irreversible Bindung eines Teils des Tracers an der Mikrotiterplatte (siehe Abb. 26) könnte diesen Effekt eventuell etwas abmildern.

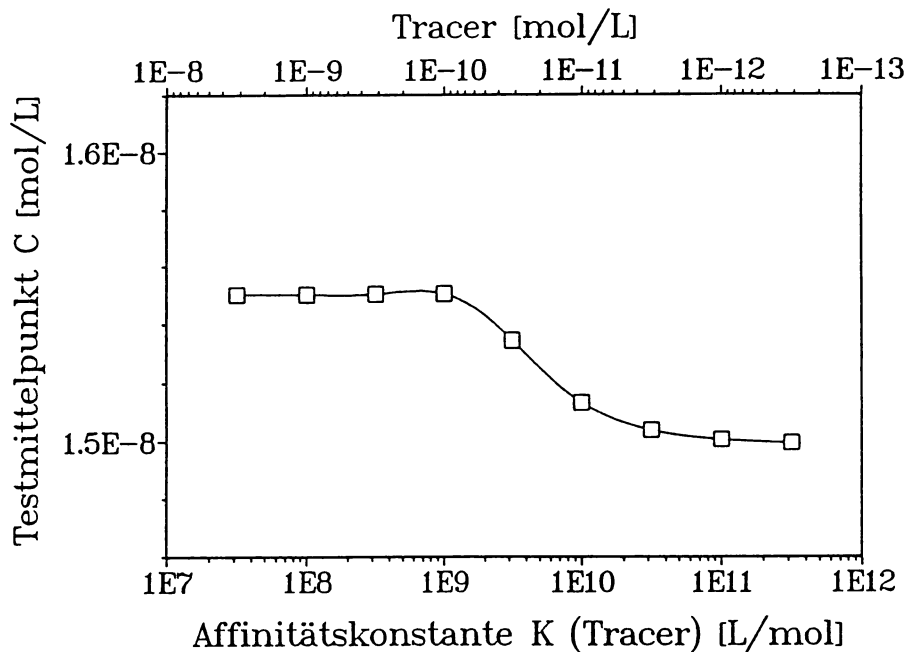


**Abb. 100:** Variation der Traceraffinität (Simulation). Testmittelpunkt über Affinitätskonstante des Tracers, Gesamtdauer: 18 min, Zeitinkrement: 0.025 s,  $[Y]_0 = 10^{-12}$  mol/L,  $[T]_0 = 10^{-9}$  mol/L, Tracer:  $k_1 = 10^7$  L/mol·s,  $k_{-1}$  = variabel, Analyt:  $k_2 = 10^7$  L/mol·s,  $k_{-2} = 10^{-1}$  1/s, Analytzugabe  $t = 1$  min, Tracerzugabe  $t = 6$  min, Waschen  $t = 16$  min bis  $t = 18$  min. Volumen: Analyt 200  $\mu$ L, Tracer 100  $\mu$ L.

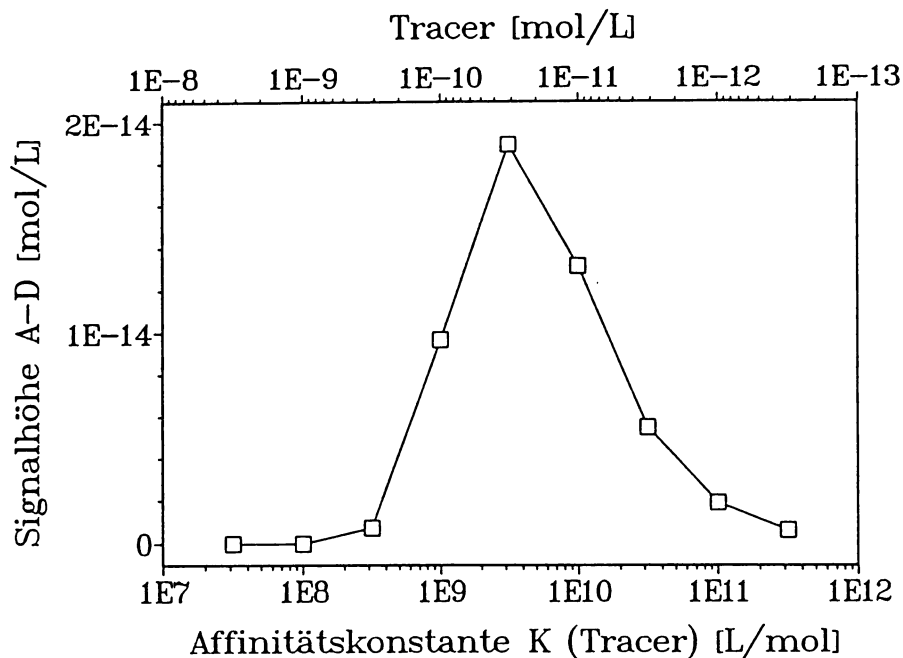


**Abb. 101: Variation der Traceraffinität (Simulation).** Signalhöhe über Affinitätskonstante des Tracers, Gesamtdauer: 18 min, Zeitinkrement: 0.025 s,  $[Y]_0 = 10^{-12}$  mol/L,  $[T]_0 = 10^{-9}$  mol/L, Tracer:  $k_1 = 10^7$  L/mol·s,  $k_{-1}$  = variabel, Analyt:  $k_2 = 10^7$  L/mol·s,  $k_{-2} = 10^{-1}$  1/s, Analytzugabe  $t = 1$  min, Tracerzugabe  $t = 6$  min, Waschen  $t = 16$  min bis  $t = 18$  min. Volumen: Analyt 200  $\mu$ L, Tracer 100  $\mu$ L.

Eine weitere Relativierung erfährt die Theorie der schwach bindenden Tracer in nächsten Simulationsexperiment. Hier wurde die identische Variation der Affinitätskonstante des Tracers durchgeführt. Zusätzlich wurde parallel die Tracerkonzentration angepaßt. Eine Verzehnfachung der Affinitätskonstante wurde mit einem Zehntel der Tracerkonzentration ausgeglichen. Denn in der Praxis wird man die Tracerkonzentration meistens individuell optimieren und nicht eine Standardkonzentration verwenden. Der Verlauf des Testmittelpunkts in Abhängigkeit von der Tracer-Affinitätskonstante (Abb. 102) zeigt eine gegensätzliche Tendenz zur Abb. 100. Hier könnte man eine Theorie der stark bindenden Tracer aufstellen. Man beachte aber die Skalierung der Ordinate: Der Effekt ist ziemlich gering. Daher kann für praktische Zwecke eine Unabhängigkeit der Sensitivität von der Traceraffinität postuliert werden, sofern man die Tracerkonzentration anpaßt.



**Abb. 102:** Variation der Traceraffinität und der Tracerkonzentration (Simulation). Testmittelpunkt über Affinitätskonstante des Tracers und Tracerkonzentration, Gesamtdauer: 18 min, Zeitinkrement: 0.025 s,  $[Y]_0 = 10^{-12}$  mol/L,  $[T]_0 = \text{variabel}$ , Tracer:  $k_1 = 10^7$  L/mol·s,  $k_{-1} = \text{variabel}$ , Analyt:  $k_2 = 10^7$  L/mol·s,  $k_{-2} = 10^{-1}$  1/s, Analytzugabe  $t = 1$  min, Tracerzugabe  $t = 6$  min, Waschen  $t = 16$  min bis  $t = 18$  min. Volumen: Analyt 200  $\mu\text{L}$ , Tracer 100  $\mu\text{L}$ .



**Abb. 103:** Variation der Traceraffinität und der Tracerkonzentration (Simulation). (Bedingungen siehe Abb. 102)

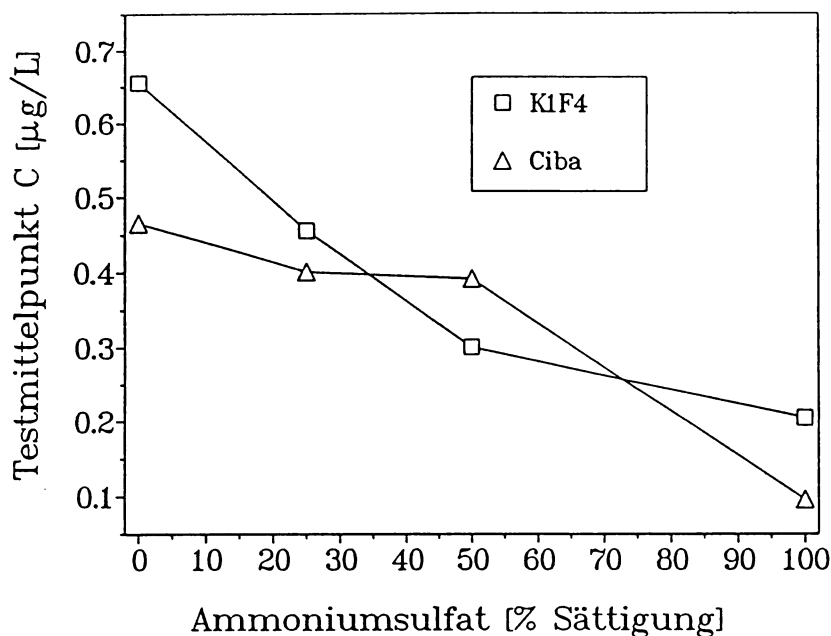
Einen ausgesprochen interessanten Verlauf zeigt die Signalhöhe (Abb. 103). Bei niedrigen Affinitäten setzt sich das Waschproblem durch: Nach dem Waschen bleiben keine nennenswerten Mengen an gebundenem Tracer übrig. Zu höheren Affinitäten steigt auch das Signal stark an, trotz parallel verringerter Konzentration. Nach einem ausgeprägten Maximum fällt die Kurve wieder ab. Hier macht sich die niedrige Tracerkonzentration bemerkbar. Man kann also zusammenfassend sagen, daß die Theorie der schwach bindenden Tracer nach den Ergebnissen der Simulation nur im Bereich der konstanten Tracerkonzentrationen gilt. Paßt man die Tracerkonzentrationen sinnvoll an, so sind eher stark bindende Tracer von Vorteil, da sie hohe, von Waschprozeduren weitgehend unbeeinträchtigte Signale bei hoher Sensitivität ergeben.

RUPPERT [359] zeigte anhand von Triazin-Immunoassays, daß die Zumischung von Lösungsmitteln einen starken Einfluß auf den Testmittelpunkt hat. Dies alles deutet darauf hin, daß die Verwendung von Lösungsmitteln die "hydrophobe Wechselwirkung" vermindert und dadurch die Empfindlichkeit von Immunoassays beeinträchtigt.

Da die "hydrophobe Wechselwirkung" entropiegetrieben ist, war es naheliegend zu versuchen, den Ordnungszustand des Wassers noch zu erhöhen. Das Gegenteil kann mit Lösungsmitteln erreicht werden, die die Wasserstoffbrücken-Bindungen wesentlich vermindern. Wenn man Ladungsträger in Wasser einbringt, so sollte sich durch die dipolare Natur des Wassers ein hochgeordneter Zustand ausbilden. Salze sind hier gut geeignet, da sich um jedes Ion eine relativ stabile, polarisierte Wasserhülle bildet. Doch viele Salze haben sog. chaotrope Eigenschaften, d.h. sie brechen Antigen-Antikörper-Komplexe auf. Dies ist in diesem Fall natürlich unerwünscht. Ein Salz mit eher proteinstabilisierender Wirkung und zudem enorm hoher Wasserlöslichkeit ist das Ammoniumsulfat [430]-[432]. Es wurde nun versucht durch Sättigen mit Ammoniumsulfat die Affinitätskonstante von Atrazin zu erhöhen.

In Abb. 104 ist klar ersichtlich, daß der erwartete Effekt eingetreten ist. Je höher die Ammoniumsulfatkonzentration, umso niedriger wird der Testmittelpunkt. Diese Methode kann zwar keine Größenordnungen überbrücken, aber eine Verbesserung um den Faktor 3-5 erscheint doch realistisch.

Zusätzlich wurden noch weitere Stoffe auf ihre Wirkung bezüglich des Testmittelpunkts untersucht (Daten nicht dargestellt). Glycerin (87 %), Tetrabutylammoniumbromid (gesätt.), Glucose (gesätt.), PEG 20.000 (konz.),  $K_2HPO_4$  (gesätt.) und  $Na_2SO_4$  (gesätt.) hatten nur einen verschlechternden Effekt, wobei die Signalhöhen teilweise erheblich zurückgingen. Nur Ammoniumsulfat zeigte eine Verbesserung der Testmittelpunkte; die Signalhöhen veränderten sich nicht in problematischer Weise. Dies entspricht in etwa den Ergebnissen von LEVISON et al. [433], die bei Antikörper-Antigen-Komplexen (Ovalbumin/anti-Ovalbumin) einen Zusammenhang zwischen den Hofmeister-Reihen (lyotrope Reihe) und der Gleichgewichtskonstante (bzw. kinetischen Konstanten) gefunden hatten.



**Abb. 104:** Einfluß der Ammoniumsulfat-Konzentration auf den Testmittelpunkt. Antikörper: K1F4 1:20.000, RT, 48 h, Vorinkubation 100 µL Terbutryn-Eichlösung (Wasser), 100 µL Wasser bzw. Ammoniumsulfatlösung, 60 min, Tracer: *t*-Bu/Et/C6 1:20.000, 100 µL, 5 min, Entwicklung 16 min. Antikörper: Ciba 21-1 1:10.000, RT, ca. 18 h, Vorinkubation 100 µL Atrazin-Eichlösung (Wasser), 100 µL Wasser bzw. Ammoniumsulfatlösung, 90 min, Tracer: *i*-Pr/Cl/C6 1:10.000, 5 min, Entwicklung 15 min. (Testmittelpunkte angegeben wie gemessen; für direkte Vergleiche mit anderen Eichkurven müssen diese Werte korrigiert werden, da nur 100 µL Eichlösung (statt 200 µL) verwendet wurden).

Diese Resultate werden von den Arbeiten von LUCAS et al. [206] partiell gestützt. Es wurden unterschiedliche Salze, wie Calciumchlorid, Ammoniumsulfat, Kaliumchlorid und Natriumhydrogenphosphat verglichen. Bei protolysierenden Salzen wird jedoch auch der pH-Wert beeinflusst. Es wurde nicht nur bei Ammoniumsulfat, sondern durchwegs ein Trend von sinkenden Testmittelpunkten bei steigenden Salzkonzentrationen gefunden. Die Erklärung dieser etwas divergierenden Ergebnisse ist schwierig, da bei nicht vollständig optimierten Immunoassays auch Einflüsse z.B. auf die effektive Tracerkonzentration denkbar sind.

### 3.6 Die Verwendung des richtigen Markers

Obwohl der Marker nur zur "Sichtbarmachung" des immunochemischen Vorgangs dient, ist seine Auswahl nicht völlig irrelevant. Ausgehend von der molaren Konzentration des Analyten, die man bestimmen möchte, sollte man als Faustregel ca. drei Dekaden geringere Konzentrationen des Labels bestimmen können. Wenn der Analyt im mg/L-Bereich vorliegt, ist die Empfindlichkeit des Labels ziemlich unkritisch. Auf S. 17 sind mögliche Marker mit ihren Nachweisgrenzen aufgelistet. Hier kann man grob abschätzen, welche Label prinzipiell in Frage kommen. Es muß beachtet werden, daß diese Liste keineswegs den Anspruch auf Vollständigkeit stellt, es sollten eher exemplarisch wichtige Vertreter gezeigt werden. Bei der

Auswahl sollte durchaus auch die Praktikabilität eine Rolle spielen, denn Immunoassays müssen verlässlich und unkompliziert funktionieren. Label, die eine komplizierte Handhabung erfordern (z.B. Radioisotope oder Enzymkaskaden) und/oder aufwendige, teure bzw. langsame Meßgeräte erfordern, kann man sicher nicht als optimal bezeichnen. Für viele Fälle ist auch die Stabilität eines Tracers von entscheidender Wichtigkeit. Ein kurzlebiger Tracer kann die empirische Optimierung eines Immunoassays in kurzer Zeit wertlos machen.

### 3.7 Veränderungen des Testdesigns

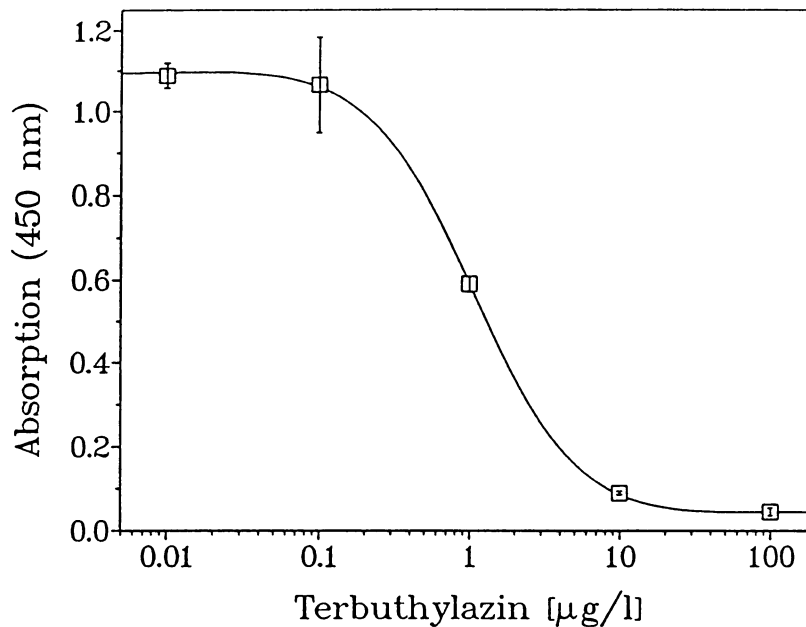
Die Probleme, die bei der Messung der Dissoziationskonstante des Tracers aufgetreten sind, haben den Wunsch verstärkt, Immunoassays weitgehend in homogener Phase durchzuführen. Hier ist nicht mit unspezifischen Adsorptionen an Oberflächen zu rechnen.

In Abb. 105 ist die Terbutylazin-Eichkurve eines pseudo-homogenen Immunoassays dargestellt. Dieses Testdesign wurde m.E. bisher noch nicht verwendet. Man benötigt dazu zwei Mikrotiterplatten, wobei die eine mit einem Blocking-Reagenz (BSA) vorbehandelt, die andere mit anti-Maus-IgG-Serum beschichtet wird. Man inkubiert in der Reihenfolge Analyt, Antikörper, Tracer in der BSA-Platte. Dann wird ein Teil der Mischung mit einer Multi-Kanal-Pipette in die Serum-Platte übertragen. Erst hier werden die Antikörper immobilisiert. Anschließend kann wie üblich gewaschen und entwickelt werden. Zur Kontrolle wurde die BSA-Platte auch entwickelt: Es konnte kein Tracer nachgewiesen werden, was die Effizienz der Blocking-Prozedur belegt.

Diese Eichkurve ist nicht so empfindlich, wie die durch die übliche Technik erhaltene. Dies liegt jedoch an der zu hohen Tracer- und Antikörperkonzentration. Es gibt Anhaltspunkte durch Messungen mit höheren Verdünnungen (Daten nicht dargestellt), daß eine adäquate Optimierung vergleichbare Empfindlichkeiten ergeben sollte.

Der pseudohomogene Ansatz mag für den Routine-Einsatz keine offensichtlichen Vorteile bieten. Zudem ist ein deutlich erhöhter Arbeitsaufwand notwendig. Dieses Experiment soll aber zeigen, daß es Konfigurationen gibt, die die Vorteile von homogenen Immunoassays mit den hohen Empfindlichkeiten der heterogenen Tests verbinden.

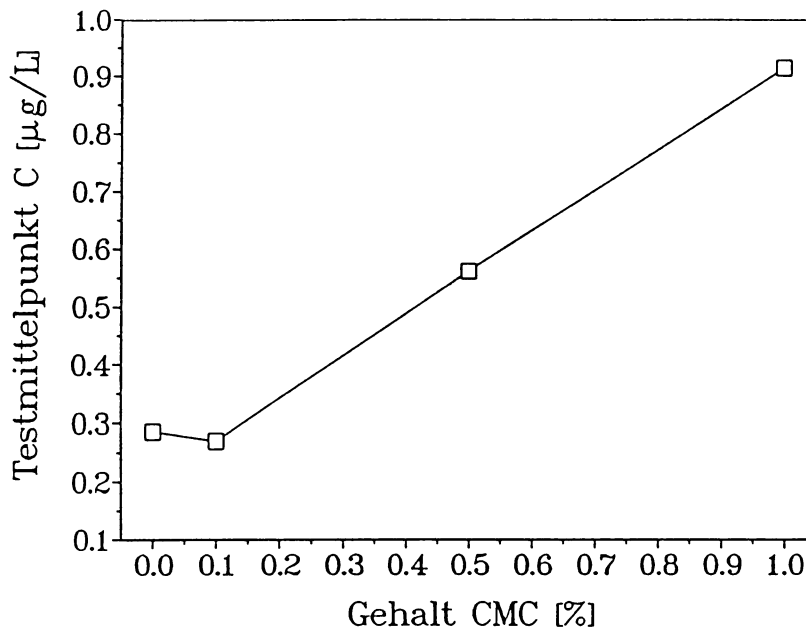
Der pseudohomogene Immunoassay gibt indirekte Hinweise auf den Einfluß der Diffusion auf den entsprechenden ELISA. Im (pseudo-)homogenen Fall wäre die Diffusion stark begünstigt. Die damit eintretende Reaktionslimitierung sollte verbesserte Testempfindlichkeiten zur Folge haben, was nicht nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 105:** Pseudohomogener Enzymimmunoassay. Vorinkubation, BSA-gecoatete Platte, BSA 1:1000, 90 min, RT, Terbutylazin (Wasser), 100 µL, 15 min, RT, Antikörper K1F4 1:10.000 (PBS), 100 µL, 1 h, Tracer *t*-Bu/Et/C6 1: 20.000 (PBS), 100 µL, 1 h, Immobilisierungsplatte: Ziege anti-Maus-IgG (Sigma) 1:5000, 200 µL, 4 h, Übertrag von 200 µL aus BSA-Platte, 90 min, Entwicklung 25 min.

### 3.8 Unspezifische Effekte

Je nach Interpretation könnten die hier aufgeführten Experimente sicherlich auch anderen Abschnitten zugeschlagen werden. Die erste Kurve Abb. 106 betrifft den Einfluß der Viskosität auf den Testmittelpunkt. Da die Viskosität nicht quantitativ bestimmt werden konnte, wurde die Konzentration des Zusatzstoffes Carboxymethylcellulose (CMC) als ungefähres Maß für die Viskosität genommen. In früheren Versuchen wurde festgestellt, daß CMC keinen spezifischen Störeinfluß auf Triazin-ELISAs ausübt. Es ist eindeutig, daß höhere CMC-Konzentrationen zu höheren Testmittelpunkten führen. Interessant ist die in dieser Auftragung nicht erkennbare Erhöhung der maximalen Absorption  $A$  mit steigender CMC-Konzentration. Es könnte sich hier um ein Mischproblem handeln. Die Zugabe des Tracers zur Probe führt ja zu einer Verdünnung des Tracers auf 33% der Ausgangskonzentration. Enthält der Tracer CMC so wird die Durchmischung und Verdünnung stark verlangsamt, was eine lokal hohe Tracerkonzentration verursacht. Dies begünstigt die Tracerbindung erheblich. Zudem wird Atrazin-Lösung partiell verdrängt, was die Konkurrenz im molekularen Bereich in Frage stellt. Dies hat wiederum eine Erhöhung des Testmittelpunkts zur Folge. Man könnte daraus schließen, daß auch bei normalen Immunoassays die Durchmischung von Probe und Tracer genau überprüft werden sollte. Unzureichende oder ungleichmäßige Durchmischung hätte gegebenenfalls sogar falsch negative Werte sowie Einbußen in der Empfindlichkeit zur Folge.



**Abb. 106:** Einfluß der Viskosität (CMC-Gehalt) auf den Testmittelpunkt. Antikörper: K1F4 1:20.000, RT, ca. 18 h, Vorinkubation Terbutylazin (Wasser) 45 min, 200 µL, Tracer: t-Bu/Et/C6 1:10.000 in PBS mit CMC-Zusatz, 100 µL, 15 min, 8fach gewaschen, Entwicklung 15 min.

Die Wichtigkeit von Blockingprozeduren wurde wiederholt unterstrichen [434]. Obwohl bei den in dieser Arbeit beschriebenen Testkonfigurationen in der Regel kein Blocking vonnöten ist, wurde ein Vergleich zweier Eichkurven mit und ohne Gelatine-Blocking angestellt (Daten nicht dargestellt). Als Antikörper wurde der monoklonale K1F4, als Tracer t-Bu/Et/C6 und als Analyt Terbutylazin verwendet. Weder die Empfindlichkeit noch die Reproduzierbarkeit ließen sich signifikant verbessern. Insofern sollte Blocking nicht im Zentrum des Interesses liegen, so lange man nicht konkrete Hinweise auf unspezifische Adsorption an der Polystyrolplatte hat.

### 3.9 Reinheit der Standards

Ein weitgehend vernachlässigtes Thema ist die Reinheitsproblematik. Oft wird dies als Spielzeug einiger Genauigkeitsfanatiker angesehen und ohne weitere Konsequenzen ignoriert. Gerade bei Immunoassays ist diese Frage jedoch von entscheidender Wichtigkeit. Als Beispiel sei nur die Messung einer Kreuzreaktion von Hydroxyatrazin genannt. Die Reinheit käuflicher, analytischer Standards im Pestizidbereich reicht ungefähr von 95-99 %. Hat die Verunreinigung, in diesem Fall z.B. Atrazin (aus dem Hydroxyatrazin gewonnen wird) eine höhere Kreuzreaktion wie der nominal angegebene Stoff, so können um Größenordnungen falsche Ergebnisse resultieren. Es wäre also denkbar, daß sich viele Kreuzreaktionen nicht primär auf den angegebenen Stoff beziehen, sondern auf die enthaltene(n) Verunreinigung(en).



Genauso wichtig sind Kenntnisse über die Stabilität von wässrigen Eichlösungen unter realistischen Laborbedingungen. Triazine sind hier glücklicherweise weitgehend unkritisch, dies sollte jedoch keineswegs ungeprüft auf andere Stoffe übertragen werden. In Abb. 107 werden zwei Eichkurven gezeigt, die mit unterschiedlich alten Eichlösungen hergestellt wurden. Schon nach einer Woche bei Raumtemperatur ist die Konzentration des Analyten auf höchstens 17 % gefallen. Dies ist ein optimistischer Wert, da die Kreuzreaktionen der Abbauprodukte nicht berücksichtigt wurden. Es erscheint vielleicht trivial, aber viele Differenzen von z.B. Testmittelpunkten könnten auf überlagerte Standards zurückzuführen sein.

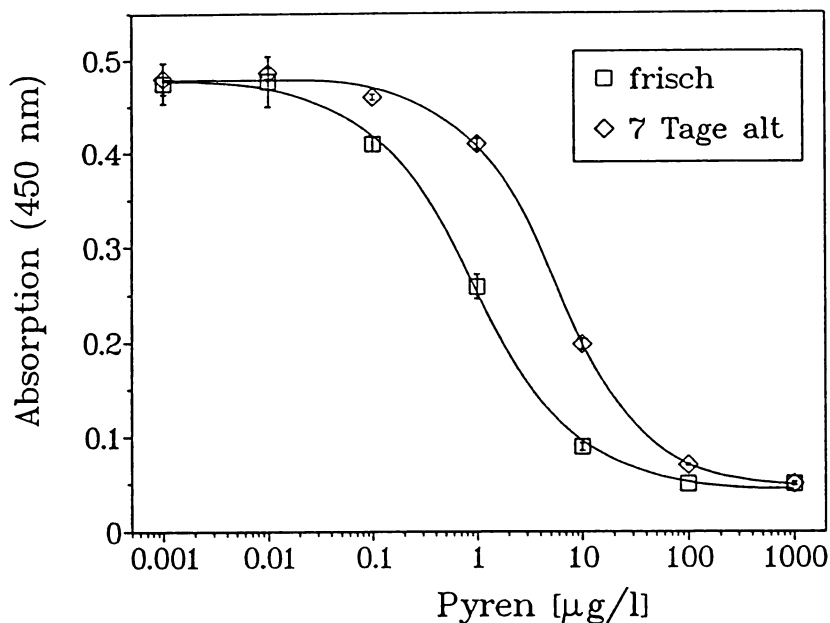


Abb. 107: Vergleich einer neuen und einer 7 Tage alten Pyreneichreihe. Antikörper: anti-Pyren Nr. 16.89 (affinitätsgereinigt), 1:500, 48 h, 200  $\mu\text{L}$ , 4 °C, Vorinkubation 30 min, Eichlösung 7 Tage bei RT und normaler Beleuchtung in Klarglas, 200  $\mu\text{L}$ , Tracer: Pyrenbuttersäure-POD 1:20.000, 15 min, 100  $\mu\text{L}$ , Entwicklung 10 min;  $n=3$ , Fehlerbalken: Spannweite.

### 3.10 Schlußfolgerungen

Bei kompetitiven Immunoassays ist die Affinität des Antikörpers zum Analyten von höchster Bedeutung. Es gibt bis heute keine Möglichkeit, ein Manko an dieser Stelle auszugleichen. Es ist nur möglich und sinnvoll, die potentielle Empfindlichkeit eines Antikörpers voll auszuschöpfen. Dies kann durch Verdünnung der Reagenzien, Verlängerung der Vorinkubationszeit, Verkürzung der Tracerinkubationszeit und Auswahl eines geeigneten Testdesigns geschehen. Es können unterschiedliche Optimierungsstrategien zu unterschiedlichen Meßbedingungen führen, die trotzdem weitgehend identische Eichkurven liefern.

## 4 Selektivität

### 4.1 Beeinflussung durch den pH-Wert

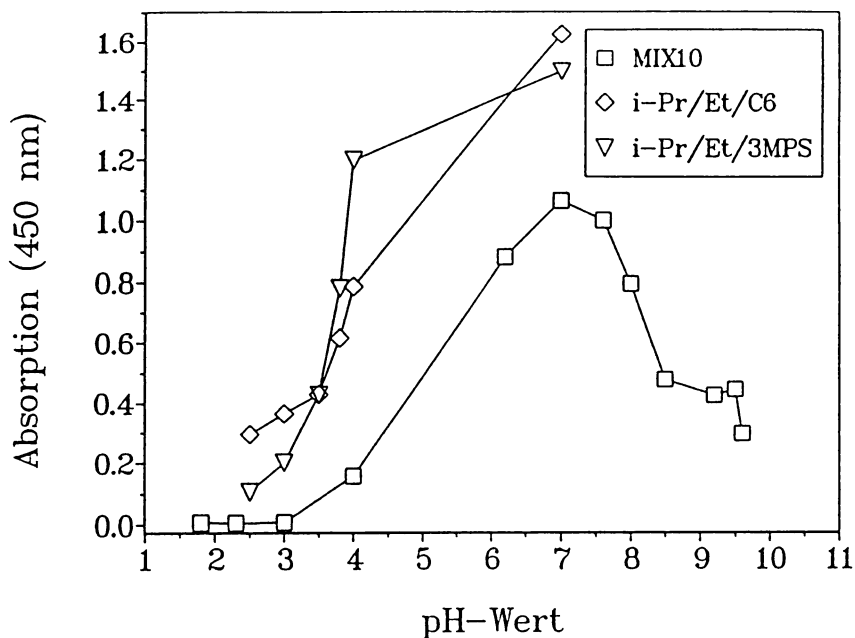
Im Verlauf eines ELISAs sind mindestens zwei Proteine am Zustandekommen des analytischen Signals beteiligt: Der Antikörper und das Markerenzym. Da bekanntlich Proteine zahlreiche protonierbare Gruppen enthalten, ist die Struktur und der Ladungszustand eines Proteins stark abhängig vom pH-Wert des umgebenden Puffers. Die strukturellen Änderungen eines Antikörpermoleküls lassen sich auch heute noch nicht genau analysieren, geschweige denn prognostizieren. Daher ist der Nutzen solcher Variationen bisher recht begrenzt. Es ist jedoch bekannt, daß  $F_{ab}$ -Fragmente (und somit Antikörperbindungsstellen) ihre Konformation bis pH 2 unverändert beibehalten können [219].

Bei Markerenzymen ist die Situation etwas übersichtlicher, da man immer dasselbe Enzym benutzen und zudem die (evtl. zeitabhängige) Veränderung der Enzymaktivität leicht empirisch ermitteln kann.

Noch wenig Aufmerksamkeit ist dagegen dem pH-Einfluß auf Haptene gewidmet worden. Dies ist umso überraschender, da man bei niedermolekularen Substanzen den  $pK_a$ -Wert oft sogar in der Literatur findet und folglich die Protonierung bei unterschiedlichen pH-Werten genau vorhersagen kann. Es wurde abgeschätzt, daß eine einzige geladene Gruppe einen Gewinn an Bindungsenergie von 15 kJ/mol erbringen kann. Dies entspricht einer Steigerung der Affinitätskonstante (und der Sensitivität des Tests) um mehr als den Faktor 400 [219].

Als Modellsystem wurde der monoklonale Antikörper K1F4 ausgewählt, der eine ausgeprägte Schwachstelle aufweist: So kann dieser Antikörper nicht zwischen Terbutylazin und Terbutryn unterscheiden; die Kreuzreaktionen dieser Substanzen sind gleichermaßen hoch. Da dieser Antikörper zunehmend in der Praxis zur Bestimmung von Terbutylazin im Wasser und im Boden eingesetzt wird, ist die hohe Kreuzreaktion von Terbutryn negativ zu werten. Günstigerweise unterscheiden sich Terbutylazin ( $pK_a$  2.0) und Terbutryn ( $pK_a$  4.3) recht deutlich in ihrer Basizität [435]. Es wurde nun untersucht, ob sich die protonierten Triazine in ihren Bindungseigenschaften zu K1F4 signifikant von den unprotonierten Spezies unterscheiden und ob man gegebenenfalls diese Unterschiede analytisch ausnutzen kann. (Hinweis: Melamin-Derivate (z.B. t-Bu/Et/C6) haben einen  $pK_a$  von ca. 5.8 [436] und sind damit noch wesentlich basischer als die Thiomethyltriazin-Gruppe. Dies muß bei der Auswahl der Tracer beachtet werden.)

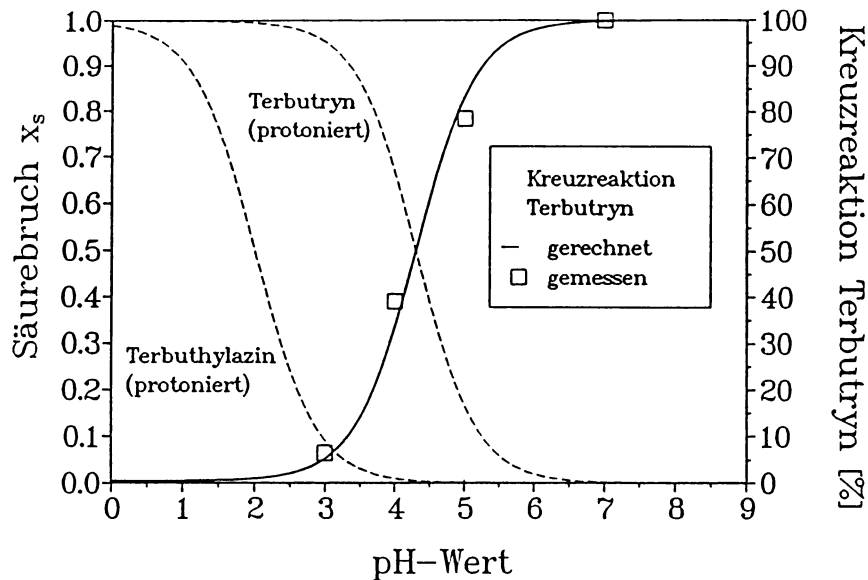
In Vorversuchen (Abb. 108) wurde geklärt, in welchem pH-Bereich ein Immunoassay überhaupt durchgeführt werden kann. Überraschenderweise ist dieses pH-Fenster viel größer als erwartet: So dürften die Grenzen ungefähr bei pH 3 im sauren und bei pH 10 im basischen Bereich liegen, Ausnahmen nicht ausgeschlossen. Hierbei ist zu beachten, daß auch die Denaturierung eines Proteins ein sowohl zeit- als auch temperaturabhängiger Vorgang ist.



**Abb. 108:** Abhängigkeit der Signalhöhe vom pH-Wert des Inkubationspuffers. Platte: SLT Chembond (Oxiran-aktiviert), AK: K1F4 1:10.000 (PBS), 24h, RT, Blocken: 20 g/L Lysin, 24 h, Puffer: 100  $\mu$ L, 5 min, Tracer: i-Pr/Et/3MPS 1:5000 (dest.), oder i-Pr/Et/C6 1:10.000 (dest.), 100  $\mu$ L, 8 min, Waschen, Häm-PBS, 200  $\mu$ L, 3 min, Entwicklung: 2-15 min, auf 1 min korrigiert. AK: K1F4 1:20.000 (Coating-Puffer), Standard-Platte, ca. 18 h, RT, Puffer (PBS): 100  $\mu$ L, 10 min, Tracer: MIX10 1:10.000 (dest.), 10 min., Entwicklung 3 min, auf 1 min korrigiert.

Eventuell auftretende Aktivitätsverluste von Antikörpern bzw. Tracern müssen durch eine erhöhte Konzentration ausgeglichen werden. Es wurden nun bei 4 verschiedenen pH-Werten die Kreuzreaktionen von Terbutryn relativ zu Terbutylazin ermittelt. Erstaunlicherweise läßt sich die Veränderung der Kreuzreaktion durch eine einfache Theorie richtig prognostizieren: Man geht davon aus, daß die protonierten Spezies eine zu vernachlässigende Kreuzreaktion aufweisen, d.h. extrem schlecht binden. Da Terbutryn einen höheren  $pK_a$ -Wert im Vergleich zu Terbutylazin aufweist, wird Terbutryn stärker protoniert, was seine Kreuzreaktion stark reduziert. Theoretisch ist der Selektivitätsgewinn durch den Quotienten der  $K_a$ -Werte festgelegt. So kann ein  $pK_a$ -Unterschied von z.B. einer Einheit die Kreuzreaktion um den Faktor 10 vermindern. In Abb. 109 wurden die Säurebrüche [437] der Analyten gegen den pH-Wert aufgetragen und der theoretisch zu erwartende Kreuzreaktionsverlauf den Meßwerten gegenübergestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Protonierung von Analyten bei Immunoassays eine große Rolle spielen kann. Dies dürfte insbesondere bei Aminen, Carbonsäuren (z.B. 2,4,5-T), Phenolen usw. der Fall sein. Die Veränderung des pH-Werts bietet sich insbesondere für den Aufbau von mehrdimensionalen immunologischen Analysensystemen (Arrays) an, die noch wesentlich mehr Information als einzelne Immunoassays zu liefern imstande sind.



**Abb. 109:** Kreuzreaktion von Terbutryn in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Kreuzreaktionen von Terbutryn und Terbuthylazin bei pH 7.0 wurden jeweils 100% gesetzt. Die gerechnete Kurve entspricht dem Quotienten  $(\text{Anteil unprotoniertes Terbutryn})/(\text{Anteil unprotoniertes Terbuthylazin}) \cdot 100$ .

Die Variation des pH-Wertes ist nur als ein Beispiel einer "Derivatisierung" des Analyten anzusehen, die erhebliche Selektivitätsverbesserungen ermöglichen kann. So sind sowohl nicht-kovalente Komplexbildungen (die bei Immunoassays für Schwermetalle ausgenutzt wurden [438]) als auch chemische Umsetzungen denkbar. Hierbei sollte aber im Auge behalten werden, daß Immunoassays von ihrer Natur her schnell und einfach sein sollen - aufwendige Derivatisierungen widersprechen diesem Prinzip und sind daher meist nicht sinnvoll.

Interessant ist die Tatsache, daß die protonierten Triazine eine derart niedrige Kreuzreaktion aufweisen. Geht man von vorwiegend hydrophoben Wechselwirkungen aus, so ist dieses Ergebnis eher überraschend. Betrachtet man jedoch die Mesomeriestabilisierung der Triazinherbizide sowie ihre Tautomere, so ist festzuhalten, daß im Normalfall Rotationsbarrieren vorhanden sein dürften, die koplanare Konfigurationen begünstigen müßten. Im Falle einer Protonierung von außen verändert sich die Situation grundlegend: Es sind keine günstigen Grenzstrukturen mehr vorhanden, die einen Doppelbindungscharakter verursachen würden. Es ist also zu erwarten, daß nach einer Protonierung freie Drehbarkeit der Substituenten eintritt. Die zahlreichen ungünstigen Konformere könnten daher eine starke Verminderung der Kreuzreaktion zur Folge haben. Zudem kommt ein "Umpolungseffekt" der Partialladungen, was repulsive elektrostatische Wechselwirkungen verursachen kann.

Vielleicht noch wichtiger ist die Anwendung im Bereich der Immunogensynthese. Bisher wurde der Protonierungszustand des Analyten im Test weitgehend ignoriert. Es erscheint

jedoch leicht ersichtlich, daß das Immunogen diesen Protonierungszustand so gut wie irgend möglich imitieren muß. Strukturpaare wie Carbonsäure/Amid, Amin/Amid, Phenol/Phenol-ether etc. sind daher meist als nicht adäquat anzusehen und führen daher fast zwangsläufig zu unbefriedigenden Ergebnissen.

Auch Tracersynthesen können von diesen Erkenntnissen profitieren: Heterologe Tracer, die sich in ihrem  $pK_a$  stark vom Immunogen unterscheiden, können bei entsprechenden pH-Werten unerwünscht niedrige Affinitäten aufweisen. Andererseits könnte man sich auch Anwendungen vorstellen, bei denen ein Antikörper/Hapten-Komplex schnell und gezielt gespalten werden soll. Dies wäre in einem geeigneten System durch einen pH-Sprung elegant zu bewerkstelligen.

## 4.2 Beeinflussung durch Inkubationszeiten

In verschiedenen Publikationen (siehe S. 179) wird behauptet, kurze Tracerinkubationszeiten (sequential incubation) führe zu stark erhöhten Kreuzreaktionen. Es wird daher empfohlen, für selektive Tests Gleichgewichtsbedingungen anzuwenden: Jede auch nur geringe Abweichung vom Gleichgewicht hätte verheerende Selektivitätseinbußen zur Folge. Im Zusammenhang mit der Untersuchung von Kurzinkubation für die Verbesserung der Sensitivität wurden auch einige Kreuzreaktionen vermessen, um diese Hypothesen zu überprüfen. Zur größten Überraschung konnte in keinem Fall ein signifikanter Anstieg der Kreuzreaktion nachgewiesen werden (Tabelle 10). Im Gegenteil, die Kreuzreaktionen schienen in einigen Fällen abgesunken zu sein. Die Erklärung erschien schwierig. Daher wurden Simulationen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt (Tabellen 11, 12 und 13).

**Tabelle 10: Kreuzreaktionen (C193) bei unterschiedlichen Tracerinkubationszeiten.**

Substanz	Kreuzreaktion [%] (Inkubation 3 min)	Kreuzreaktion [%] (Inkubation 2 h)	Testmittelpunkt [mol/L] (Inkubation 3 min)	Testmittelpunkt [mol/L] (Inkubation 2 h)
Atrazin	100	100	$1.84 \cdot 10^{-10}$	$2.95 \cdot 10^{-9}$
Desethylatrazin	0.28	0.34	$6.63 \cdot 10^{-8}$	$8.71 \cdot 10^{-7}$
Hydroxyatrazin	< 0.004	< 0.06	$> 5 \cdot 10^{-6}$	$> 5 \cdot 10^{-6}$
Terbuthylazin	3.06*	5.92*	$4.84 \cdot 10^{-9}$	$5.69 \cdot 10^{-8}$
Simazin	2.50*	8.91*	$5.92 \cdot 10^{-9}$	$3.78 \cdot 10^{-8}$
Propazin	47.65*	152.5*	$3.10 \cdot 10^{-10}$	$2.21 \cdot 10^{-9}$
Ametryn	0.55	0.53	$3.34 \cdot 10^{-8}$	$5.54 \cdot 10^{-7}$
i-Pr/Cl/C6**	741.6*	927.2*	$1.09 \cdot 10^{-10}$	$2.93 \cdot 10^{-10}$
i-Pr/Cl/C2**	1.54*	1.31*	$3.10 \cdot 10^{-8}$	$2.02 \cdot 10^{-7}$

\* Diese Kreuzreaktionen beziehen sich auf die Atrazineichkurve der betreffenden Mikrotiterplatte und nicht auf die in der ersten Zeile angegebenen Werte.

\*\* Die kurze Inkubationszeit betrug hier 5 min, die lange 60 min.

Tabelle 11: Simulierte Kreuzreaktionen (I).

K [L/mol]	CR <sub>GG</sub> [%]*	CR <sub>100 min</sub> [%]	CR <sub>10 min</sub> [%]	CR <sub>1 min</sub> [%]	CR <sub>0.1 min</sub> [%]
10 <sup>7</sup>	0.1	0.11	0.12	0.11	0.10
10 <sup>8</sup>	1	1.1	1.2	1.1	1.0
10 <sup>9</sup>	10	11.0	12.1	11.3	12.3
10 <sup>10</sup>	100	100	100	100	100
10 <sup>11</sup>	1000	532	356	290	255
10 <sup>12</sup>	10.000	1134	492	347	299
10 <sup>13</sup>	100.000	1430	513	354	305
10 <sup>14</sup>	1.000.000	1492	515	355	305

\* Ideal, unter ungestörten Gleichgewichtsbedingungen.

Testdauer: X+8 min, Schrittweite: 0.005 s, [Y]<sub>0</sub>=10<sup>-10</sup> mol/L, [T]<sub>0</sub>=10<sup>-10</sup> mol/L,  
 $k_1=10^7$  L/mol·s,  $k_{-1}=10^{-5}$ ,  $k_2=10^8$  L/mol·s,  $k_{-2}$ =variabel, Vorinkubation: 5 min,  
 Tracerinkubation: variabel, Waschzeit: 2 min.

Die Simulation bestätigte die experimentellen Daten in vollem Umfang. Bei kurzen Inkubationszeiten sinkt die Kreuzreaktion (bei CR > 100 %) tatsächlich ab. Ein "First-come, first-served"-Effekt konnte hier augenscheinlich nicht nachgewiesen werden. Ein neues Phänomen wurde bei der Simulation hoher Kreuzreaktionen entdeckt: So kann die Kreuzreaktion nur bis zu einem bestimmten Höchstwert ansteigen. Man könnte annehmen, daß dies mit der Affinitätslimitierung von kompetitiven Tests zu tun hat.

Betrachten wir uns die Situation im Gleichgewichtsfall: Bei niedrigen Affinitätskonstanten ist der Testmittelpunkt vollständig durch K determiniert. Kleinere Variationen bewirken daher eine Kreuzreaktion, die mit den Affinitätskonstanten konform geht. Bei hohen Affinitätskonstanten hingegen müßte mit wesentlich geringeren Tracer- und Antikörperkonzentrationen gearbeitet werden, um ein affinitätslimitiertes Regime zu erreichen. Das bedeutet, daß hohe Affinitätskonstanten zu konzentrationslimitiertem Verhalten führen. Der Übergang von einem Regime ins andere wird auch durch die simulierte Änderung der Steigung der Eichkurven untermauert. So erhält man im affinitätslimitierten Bereich Steigungen die sehr nahe bei 1 liegen. Kommt man in den konzentrationslimitierten Bereich, so werden die Kurven signifikant steiler ( $B > 1$ ).

Jetzt stellt sich natürlich die Frage, was es nun mit dem "First-come, first-served"-Effekt auf sich hat. Die folgenden beiden Tabellen basieren auf dem identischen Datenmaterial wie Tabelle 11. Da es willkürlich und oft zufällig ist, welche Substanz die Kreuzreaktion 100 % zugeordnet bekommt, werden hier zwei unterschiedliche Fälle durchgerechnet. Im ersten Fall wird die Substanz mit der relativ niedrigen Affinitätskonstante 10<sup>8</sup> L/mol 100 % gesetzt, im

zweiten Fall die hochaffine Substanz mit  $K=10^{12}$  L/mol. Zugunsten größerer Übersicht werden nur noch drei Inkubationszeiten (100, 10 und 1 min) bei jeweils drei formalen Kreuzreaktionen (1000, 100 und 10 %) verglichen.

**Tabelle 12: Simulierte Kreuzreaktionen (II).**

K [L/mol]	CR <sub>GG</sub> [%]*	CR <sub>100 min</sub> [%]	CR <sub>10 min</sub> [%]	CR <sub>1 min</sub> [%]
10 <sup>7</sup>	10	10.2	10.0	10.0
10 <sup>8</sup>	100	100	100	100
10 <sup>9</sup>	1000	988	979	1001

\* Ideal, unter ungestörten Gleichgewichtsbedingungen.

Testdauer: X+8 min, Schrittweite: 0.005 s,  $[Y]_0=10^{-10}$  mol/L,  $[T]_0=10^{-10}$  mol/L,  $k_1=10^7$  L/mol·s,  $k_{-1}=10^{-5}$  1/s,  $k_2=10^8$  L/mol·s,  $k_{-2}$ =variabel, Vorinkubation: 5 min, Tracerinkubation: variabel, Waschzeit: 2 min.

**Tabelle 13: Simulierte Kreuzreaktionen (III).**

K [L/mol]	CR <sub>GG</sub> [%]*	CR <sub>100 min</sub> [%]	CR <sub>10 min</sub> [%]	CR <sub>1 min</sub> [%]
10 <sup>11</sup>	10	47.0	72.4	83.4
10 <sup>12</sup>	100	100	100	100
10 <sup>13</sup>	1000	126	104	102

\* Ideal, unter ungestörten Gleichgewichtsbedingungen.

Testdauer: X+8 min, Schrittweite: 0.005 s,  $[Y]_0=10^{-10}$  mol/L,  $[T]_0=10^{-10}$  mol/L,  $k_1=10^7$  L/mol·s,  $k_{-1}=10^{-5}$  1/s,  $k_2=10^8$  L/mol·s,  $k_{-2}$ =variabel, Vorinkubation: 5 min, Tracerinkubation: variabel, Waschzeit: 2 min.

Die Interpretation fällt nun relativ leicht: Im affinitätslimitierten Bereich (niedrige Affinitätskonstanten) sind keine signifikanten Veränderungen durch Kurzinkubation des Tracers zu erkennen. Dies entspricht weitgehend dem experimentellen Befund. Zudem entsprechen die Kreuzreaktionen dem Verhältnis der Affinitätskonstanten.

Bei hohen Affinitätskonstanten hingegen zeigt sich ein stark verschobenes Bild. Kreuzreaktionen < 100 % werden im Nichtgleichgewichtsfall überbewertet. Dies entspricht der Beobachtung des "First-come, first-served"-Effekts. Es ist also zu erwarten, daß diese Komplikation nur bei Assays auftritt, die mit hochaffinen Antikörpern arbeiten. Dies ist z.B. bei vielen Protein-Immunoassays der Fall. Andererseits kann man in diesem Fall nicht

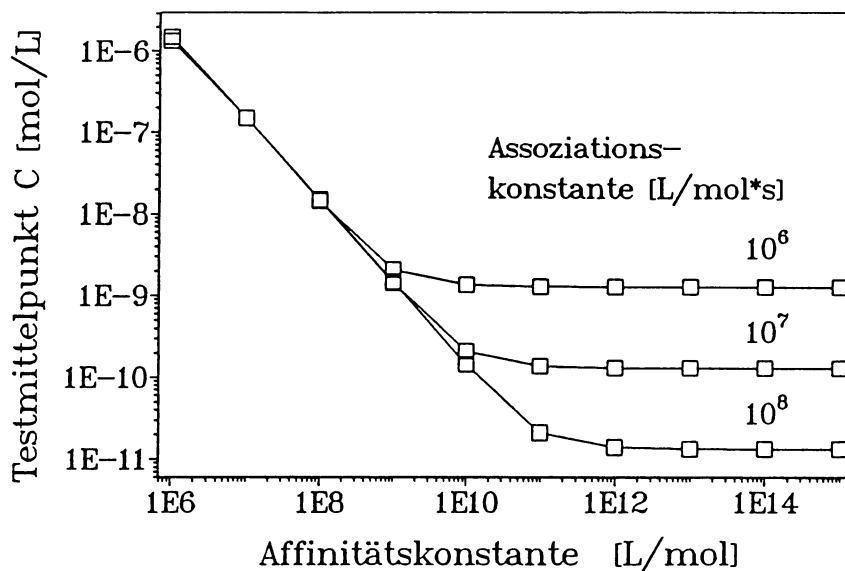


allgemein von einer erhöhten Kreuzreaktion sprechen. Bei Kreuzreaktionen  $> 100\%$  wird die Kreuzreaktion bei Kurzinkubation stark unterbewertet. Es zeigen sich Ansätze zu einem gruppenspezifischen Assay. Bei einer Inkubationszeit von 1 min gehen hier alle Substanzen mit Affinitätskonstanten  $> 10^{11}$  mit rund  $100\%$  Kreuzreaktion in den Test ein.

Nun muß man sich fragen, welcher Mechanismus diese obere Kreuzreaktionsgrenze verursacht. Wie schon oben erwähnt, kommt natürlich eine Konzentrationslimitierung in Betracht. Doch versucht man auf dem Simulationsweg durch extreme Verdünnungen von Tracer und Antikörper einen "idealen" Kreuzreaktionsverlauf zu erhalten, so wird man enttäuscht. Die Eichkurven bleiben weitgehend fest auf einer Stelle, unabhängig von der Affinitätskonstante des Analyten. Geht man dem Problem auf den Grund, so erkennt man eine interessante Konstellation. Weder die Affinitätskonstante, noch irgendeine Konzentration sind hier verantwortlich. Es handelt sich um eine Assoziationslimitierung.

Da Assoziationsreaktionen oft nach einer Kinetik zweiter Ordnung behandelt werden können, wird die Assoziationsgeschwindigkeit bei starker Verdünnung des Analyten entsprechend abnehmen. Es gilt dann nicht mehr die Annahme, daß in wenigen Minuten das Gleichgewicht erreicht wird. Übrigens gilt für jede Eichkurve, daß der niedrigste Standard am langsamsten ins Gleichgewicht geht. Da die Assoziationskonstanten bei immunologischen Reaktionen Hapten/Antikörper nur sehr wenig variabel sind, wird am Anfang der Reaktion (Kurzinkubation) der Analyt proportional zu seiner Konzentration gebunden und dies weitgehend unabhängig von seiner Affinitätskonstante (bzw. Dissoziationskonstante). Dies bedeutet nichts anderes, als daß die Testmittelpunkte in diesen assoziationslimitierten Bereichen konstant sind und einen bestimmten Grenzwert nicht überschreiten können. Eine ähnliche Überlegung gilt wahrscheinlich auch im diffusionslimitierten Bereich. Hier ist der Stofftransport direkt proportional zum Konzentrationsgradienten bzw. mit  $c_0=0$  proportional zur Bulk-Konzentration. Auch in diesem Fall taucht die Affinitätskonstante höchstens in einer Randbedingung auf.

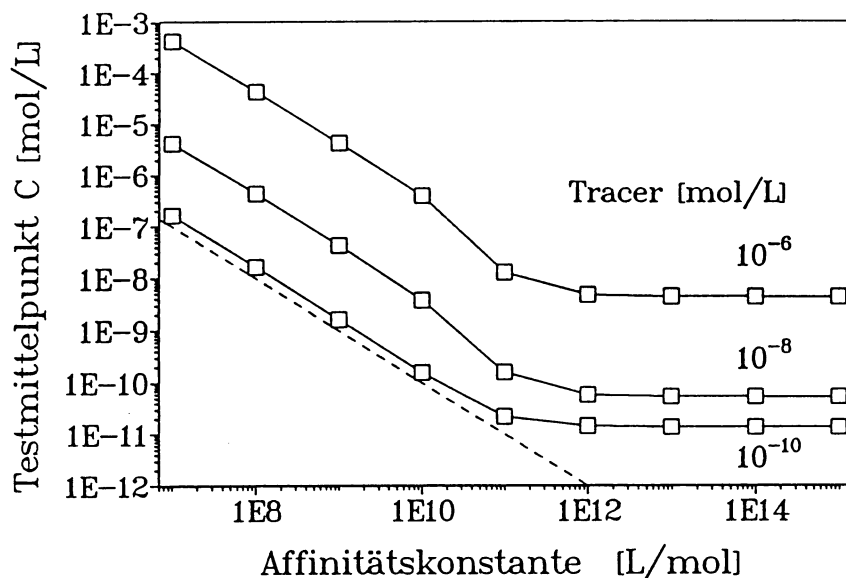
Die Assoziationskonstante des Analyten (Abb. 110) begrenzt die maximale Kreuzreaktion bei niedrigen Konzentrationen, hohen Affinitätskonstanten und relativ kurzen Analyt-Inkubationszeiten. Dies bedeutet, daß insbesondere große Analytmoleküle (z.B. Proteine) gefährdet sind. Da im Gleichgewicht diese Limitierung völlig verschwindet, ist dies wohl der klassische Fall eines "First-come, first-served"-Effekts. Die gemeinsame Tangente bei niedrigen Affinitätskonstanten in Abb. 110 entspricht der Kreuzreaktion im Gleichgewicht. In diesem Bereich gilt (volumenkorrigiert)  $K=1/C$ . Zur Steigung B der Eichkurven kann gesagt werden, daß zwar ein Anstieg zu hohen Affinitätskonstanten zu verzeichnen ist, dieser aber unabhängig von der Assoziationskonstante zu sein scheint.



**Abb. 110: Assoziationslimitierung (Simulation).** Testdauer: 18 min, Schrittweite: 0.005 s,  $[Y]_0 = 10^{-16}$  mol/L,  $[T]_0 = 10^{-14}$  mol/L,  $k_1 = 10^7$  L/mol\*s,  $k_{-1} = 10^{-5}$  1/s,  $k_2 =$  siehe Assoziationskonstante,  $k_{-2} =$  variabel, Vorinkubation: 5 min, Tracerinkubation: 10 min, Waschzeit: 2 min.

Jetzt bleibt noch die Frage zu klären, ob hohe Tracer- bzw. Antikörper-Konzentrationen einen ähnlichen Effekt auslösen können.

In Abb. 111 ist ein besonders interessantes Phänomen dargestellt. Die Erhöhung der Tracerkonzentration führt nicht etwa zu einer analogen Konzentrationslimitierung, sondern zu einer Parallelverschiebung der Kurven. Dies bedeutet, daß zwar die Empfindlichkeit des Tests durch hohe Tracerkonzentrationen leidet, die Kreuzreaktionen ändern sich jedoch kaum. Die relativen Verhältnisse bleiben gewahrt. Es ist jedoch zu erkennen, daß eine zusätzliche Krümmung bei höheren Tracerkonzentrationen auftritt, die dazu führt, daß die Assoziationslimitierung etwas später eintritt. Dies ist sehr schlüssig zu erklären, da bei einer Assoziationsreaktion die Erhöhung einer Eduktkonzentration zur Vergrößerung der Assoziationsgeschwindigkeit führt. Wie in Abb. 110 leicht ersichtlich ist, führt eine Beschleunigung der Assoziation zu einer Unterdrückung der Assoziationslimitierung bzw. zu einer Parallelverschiebung der Kurve nach unten. An der betreffenden Stelle könnten sich Kreuzreaktionen pathologisch verhalten, d.h. die Kreuzreaktion ( $< 100\%$ ) wäre kleiner als das Verhältnis der Gleichgewichtskonstanten. Wie man in der Nähe der theoretischen Grenze (gestrichelte Linie) erkennt, verschwindet dieses pathologische Verhalten bei niedrigeren Tracerkonzentrationen. Was die Eichkurvensteigung B angeht, so ist ein Einfluß der Tracerkonzentration zu erkennen. So werden maximale Steigungen bei den höchsten  $[T]_0$ -Werten erhalten.



**Abb. 111: Konzentrationseinfluß des Tracers (Simulation).** Testdauer: 18 min, Schrittweite: 0.005 s,  $[Y]_0 = 0.01 \cdot [T]_0$  mol/L,  $[T]_0 =$  siehe Graphik,  $k_1 = 10^7$  L/mol·s,  $k_{-1} = 10^5$  1/s,  $k_2 = 10^8$  L/mol·s,  $k_{-2} =$  variabel, Vorinkubation: 5 min, Tracerinkubation: 10 min, Waschzeit: 2 min.

Diese Überlegungen zeigen, daß es in diesem Zusammenhang nur eine Methode geben dürfte, einen echten Summentest zu entwickeln: Man muß den assoziationslimitierten Bereich bei extrem geringen Reagenzkonzentrationen und kurzen Inkubationszeiten erreichen.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß bei den hier diskutierten Problemen die Vorinkubationszeit und die Tracerinkubationszeit streng unterschieden werden müssen. Die Assoziationskonstante ist in erster Linie limitierend für kurze Vorinkubationszeiten. Somit sind kurze Vorinkubationszeiten eine Voraussetzung für das Auftreten des "First-come, first-served"-Effekts. Nicht kurze Tracerinkubationszeiten verursachen Nichtselektivität, sondern kurze Vorinkubationszeiten des Analyten.

### 4.3 Schlußfolgerungen

Die Selektivität eines Immunoassays läßt sich, abgesehen vom Austausch des Antikörpers, nur schwer beeinflussen.

Günstige Ansatzpunkte liefert der  $pK_a$ -Wert des Analyten bzw. der kreuzreagierenden Substanzen. Es ließ sich zeigen, daß durch gezielte Protonierung bestimmte störende Substanzen weitgehend ausgeschaltet werden können. Dies ist natürlich nur in einem begrenzten pH-Wert-Bereich möglich, der ungefähr zwischen 3 und 9 liegt.

Die Inkubationszeit des Tracers hat in dem untersuchten Rahmen keinen nennenswerten Einfluß auf die Kreuzreaktionen. Dies steht in offenem Widerspruch zu der verbreiteten Meinung, Kurzinkubationen würden allgemein zu Einbußen der Selektivität führen. Diese "First-come, first-served"-Theorie wurde durch Computersimulationen überprüft. Es konnte gezeigt werden, daß der postulierte Verlust an Selektivität nur unter bestimmten Bedingungen (hohe Affinitätskonstanten und kurze Vorinkubationszeiten des Analyten) auftritt.

Somit löst sich der scheinbare Widerspruch zwischen den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen und den diskutierten Literaturangaben auf: Differenziert man genau zwischen Vorinkubation des Analyten und Tracerinkubation, so kann man den Schluß ziehen, daß zu kurze Vorinkubationen Selektivitätseinbußen zur Folge haben (Assoziationslimitierung). Dies ist nicht der Fall bei kurzen Tracerinkubationen.

Berechnungen haben zur Skizzierung eines neuen Testprinzips geführt, die den gefürchteten Selektivitätsverlust ausnutzt. So kann man sich "assoziationslimitierte" Tests vorstellen, die mit kurzen Inkubationszeiten und niedrigen Reagenzkonzentrationen einen idealen Summentest ermöglichen würden und in Grenzen unabhängig von den (unterschiedlichen) Affinitäten wären.

Andererseits konnte gezeigt werden, daß unter Einhaltung bestimmter Randbedingungen die Kreuzreaktionen auch exakt proportional zu den Affinitätskonstanten sein können. Dies bedeutet, daß Kreuzreaktionen durchaus eine kalkulierbare Größe sind und nicht unberechenbar von kleinen Testvariationen abhängen müssen.

## **5 Herstellung von monoklonalen Antikörpern**

### **5.1 Allgemeines**

Da in dieser Arbeit keine systematischen Untersuchungen zur Herstellung von Antikörpern durchgeführt wurden, soll auf die Beschreibung von Immunisierungsverfahren, Zellkulturen, Produktion und Reinigung von Antikörpern weitgehend verzichtet werden. Hier sei auf das umfangreiche Angebot an Standard-Literatur [439]-[443] verwiesen, in dem viele Prozeduren im Detail beschrieben und diskutiert werden.

Über die Anwendung des Hybridoma-Verfahrens<sup>19</sup> sollten Triazin-selektive Antikörper gewonnen werden. Um die Wahrscheinlichkeit eines Erfolges zu erhöhen, wurde ein Carrier (KLH) angewendet, der 10 verschiedene Triazin-Haptene trägt (siehe Experimenteller Teil). Darunter waren Derivate mit Alkylamino-, Amino-, Hydroxy-, Thiomethyl- und Chlor-

---

<sup>19</sup> Die Immunisierung sowie die mit Zellkulturen verbundenen Schritte wurden von einer Arbeitsgruppe am NMI (Naturwissenschaftliches und medizinisches Institut, Reutlingen) durchgeführt.

Substituenten. Parallel wurde auch ein völlig analoges BSA-Derivat und ein Peroxidase-Tracer synthetisiert. Da Peroxidase jedoch nur wenige (1-3) Aminogruppen zur Kopplung zur Verfügung stellt, kann dieser Tracer auch als Mischung aus verschiedenen Triazin-Tracern ("MIX10") angesehen werden.

## 5.2 Screening

Die übliche Methode des Klon-Screenens [444] besteht darin, Mikrotiterplatten mit Antigen zu beschichten und die Zellkulturüberstände in den Kavitäten zu inkubieren. Nach einem Waschschrift werden gebundene (Maus-) Antikörper mit einem kommerziell erhältlichen anti-(Maus-IgG)-Peroxidase-Konjugat markiert und nach einem weiteren Waschschrift enzymatisch nachgewiesen. Es zeigte sich sehr bald, daß diese Methode nicht geeignet ist, Antikörper hoher Affinität mit großer Selektivität zu detektieren. Es scheint eher so, daß auch sehr schwach bindende Antikörper ein meßbares Signal ergeben. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, daß bei Antigen-immobilisierten Tests auch bivalente Komplexe gebildet werden können, die eine sehr viel höhere Stabilität als monovalente Komplexe aufweisen [445].

Von der Annahme ausgehend, daß gute Antikörper auch einen Enzymtracer gut binden müssen, wurde eine entscheidend verbesserte Methode entwickelt, positive Klone zu finden. Man geht prinzipiell von einer klassischen ELISA-Konfiguration aus, wie sie auch ähnlich zur Messung von Pestiziden verwendet werden kann. Zuerst werden Mikrotiterplatten mit anti-(Maus-IgG) beschichtet. Dann werden in jede Kavität je 100  $\mu\text{L}$  eines Zellkulturüberstands gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 2 Stunden wird die Platte gewaschen. Gegebenenfalls kann vorher der Platteninhalt für weitere Tests mittels einer Mehrkanalpipette auf eine neue anti-Maus-Platte übertragen werden. Die gewaschene Platte wird mit einer Mischung geeigneter Peroxidase-Tracer inkubiert. In diesem Fall wurde der o.g. MIX10-Tracer verwendet. Nach z.B. 20 Minuten wird nochmals gewaschen. Die Entwicklung wird wie üblich mit einem Tetramethylbenzidin/ $\text{H}_2\text{O}_2$ -Substrat durchgeführt und nach einer geeigneten Zeit mit Schwefelsäure abgestoppt. Es zeigte sich, daß diese Methode wesentlich schärfere Aussagen erlaubt und nur wenige positive Klone detektiert, die durchwegs als "interessant" eingestuft werden können (siehe auch S. 159 ff.).

Diese Eigenschaft, nur extrem wenige falsch positive Klone zu liefern ist ein entscheidendes Kriterium für ein erfolgreiches Screening-Verfahren. Da die nachfolgenden Zellzüchtungsprozeduren, sowie die Charakterisierung sehr arbeitsaufwendig sind, ist jeder falsch positive Klon eine erhebliche Belastung für das gesamte Verfahren. Um eine optimale Effizienz zu erhalten, ist es daher sehr wichtig, die Anzahl der näher zu untersuchenden Klone klein zu halten und trotzdem die richtigen Klone zu finden. Dies ist offensichtlich in erster Linie ein Selektivitätsproblem des Screenings.

In den Balkendiagrammen der Abb. 112 werden die beiden Screeningverfahren direkt gegenübergestellt. Um eine weitgehende Kontrolle der Prozedur durchzuführen, wurden auch Referenzantikörper mit bekannten Eigenschaften mitgetestet. Auch hier zeigt sich die Überlegenheit des verbesserten Verfahrens: Alle Triazin-Antikörper zeigten ein signifikantes Signal. Ein Antikörper ("V1"), der zwar Triazinkonjugate binden soll [203], jedoch bei eingehenden Tests als für analytische Zwecke ungeeignet eingestuft wurde, war bei der neuen Methode völlig negativ, beim üblichen Suchtest wurde ein Signal von 75% des Maximalwerts gemessen.

Daß wesentlich weniger positive Klone detektiert werden, zeigt die Tabelle 14, die aufgeschlüsselt nach Referenz-Antikörpern und Screening-Klonen die beiden Methoden gegenüberstellt. Die herkömmliche Methode klassifiziert fast 10mal mehr Antikörper als positiv (31%), was zu einer totalen Überschwemmung mit falsch positiven Klonen führt.

**Tabelle 14: "Klon-Statistik".**

	Gesamt-Anzahl	Herkömmliche Methode (positive Klone)		Verbesserte Methode (positive Klone)	
		Anzahl	%	Anzahl	%
positive Referenz-Klone	6	6	100	6	100
negative Referenz-Klone	1	1	100	0	0
Nullprobe	1	0	0	0	0
Screening-Klone	84	26	31	3	4

Die klassische Methode der Antigen-Immobilisierung erscheint im Falle des Klone-Screenings für die Herstellung von monoklonalen Hapten-Antikörpern ungeeignet oder zumindest ineffizient. Zur Selektion von triazinbindenden Antikörpern hat sich die hier vorgestellte, auf immobilisierten Antikörpern basierende Methode sehr gut bewährt. Eine vergleichbare Beobachtung wurde von WEILER [231] gemacht, der jedoch u.a. zur Vermeidung von "Brückenantikörpern" einen Tritium-RIA als ideale Screening-Methode empfiehlt.

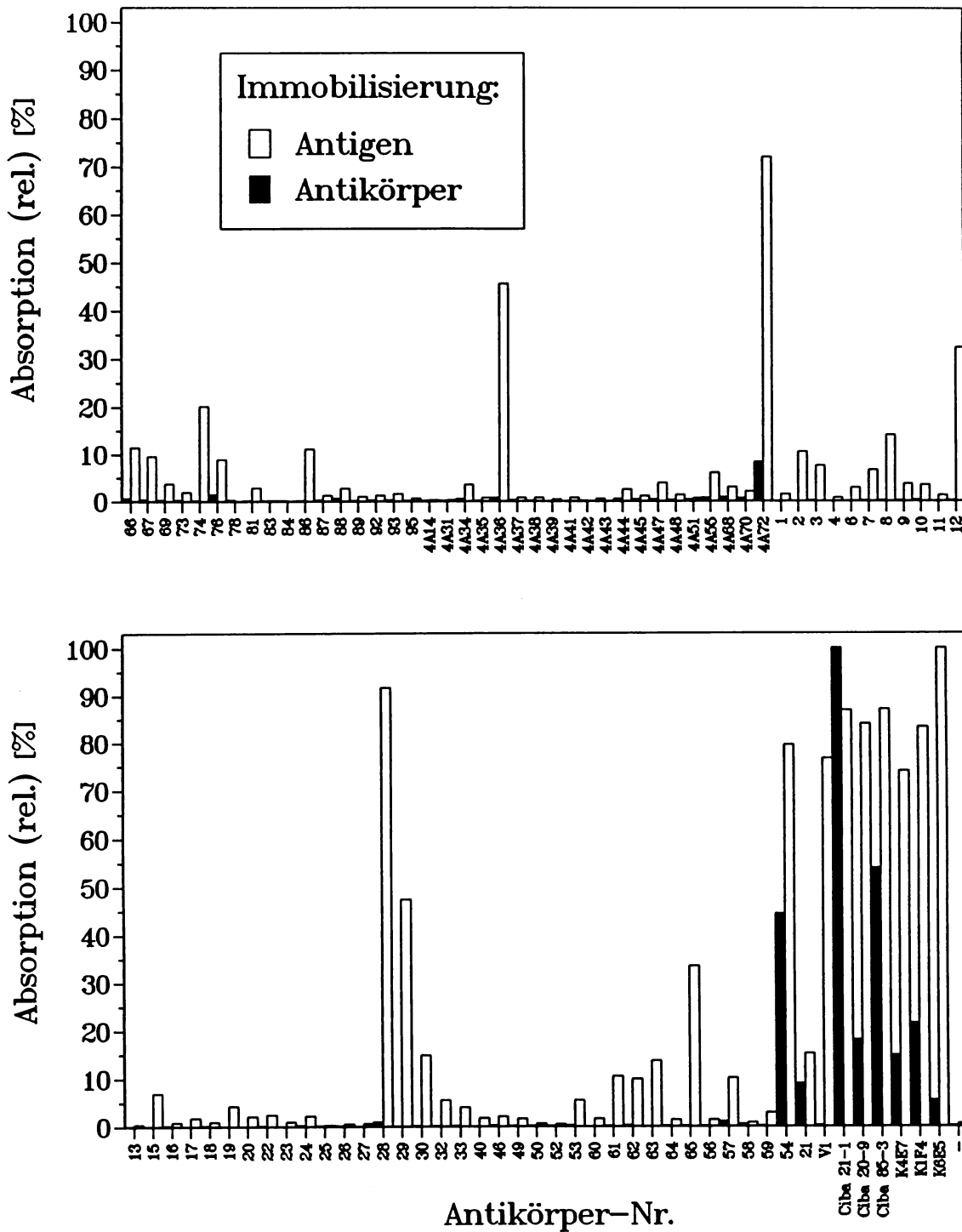


Abb. 112: Vergleich Antikörperscreening mit Antigen/Antikörper-Immobilisierung. Antigen-I.: BSA-MIX10-Konjugat 1:1000, 24 h, getrocknet, 100 µL Überstand oder Referenz-AK 1:100 in PBS, 20 h, 4°C, 8fach gewaschen, 200 µL POD-(Ziege)-anti-(Maus-IgG)-Konjugat 1:2000 in PBS (+1% BSA), 3 h, RT, Entw. 2 min.; Antikörper-I.: Ziege-anti-(Maus-IgG) 1:5000, 4 d, RT, getrocknet, 200 µL Überstand oder Referenz-AK 1:400 (PBS), 1 h, 4fach gewaschen, 200 µL POD-Tracer (MIX10) 1:10.000 20 min, 5fach Waschen, Entwicklung 20 min.

### 5.3 Antikörper-Charakterisierung

Das Finden der richtigen Klone ist zwar ein heikler Punkt - vom Arbeitsaufwand her gesehen ist die Charakterisierung der Antikörper wesentlich aufwendiger. Hierzu gehört primär die Bestimmung der Kreuzreaktionen eines Antikörpers. Dieser Schritt kann mit der Klassifizierung der Empfindlichkeit zusammenfallen. Eine wichtige Voraussetzung jedoch ist, daß man einen passenden Tracer findet. Nach der Verwendung eines Tracer-Mix zum Screenen sollte nun die Aufschlüsselung nach Tracern erfolgen. Hierzu ist aber zumindest eine grobe Normierung der Traceraktivität notwendig. Die Bindungsprofile unterschiedlicher Tracer wurden ab Seite 149 bereits ausführlich behandelt. Im folgenden werden einige, bei der o.g. Antikörper-Suche positive Klone durch ihre Kreuzreaktionen charakterisiert dargestellt. Besonders hingewiesen werden muß auf die jeweils letzte Zeile in jeder Tabelle, in der die formale "Kreuzreaktion" einer Huminsäure angegeben ist. Hier handelt es sich um eine Huminsäure (Fa. Roth), die durch Auflösen in Base und Ausfällen in Säure gereinigt und in einer in Wasser leicht löslichen Salzform gewonnen wurde [238]. Diese Huminsäure wird aus Braunkohle-Extrakten gewonnen.

Die Methode, Antikörper nach ihrer Robustheit zu Screenen, ist nicht sehr verbreitet. Es hat sich gezeigt, daß viel unnötige Mühe in die Charakterisierung von Antikörpern investiert wird, die erhebliche Schwächen aufweisen. Eine Verallgemeinerung dieses Prinzips sei hier versucht: Ist die Art des Einsatzes eines Antikörpers abzusehen, dann sollten schon in einem frühen Stadium spezielle Tests durchgeführt werden, die das spätere Umfeld des Antikörpers so gut wie möglich imitieren. Als Beispiel seien lösungsmittelfeste Antikörper genannt. In vielen Bereichen sind Zusätze oder Matrixbestandteile (Lösungsmittel für Extraktion, Lösungsvermittler, Tenside, Salze usw.) aus technischen Gründen nicht zu vermeiden. Will man Immunoassays auch in diesen Anwendungsgebieten einsetzen, so ist die aufwendige Entfernung dieser Bestandteile nur die zweitbeste Lösung. Optimal wäre der "richtige" Antikörper für den bestimmten Zweck. Eine Messung direkt ohne clean-up wird jeder Anwender vorziehen.



Tabelle 15: Kreuzreaktionen des mAK NMI 118.

Substanz	C <sup>1</sup> [mol/L]	NG <sup>2</sup> [mol/L]	Kreuz- reaktion <sup>3</sup> molar [%]	C <sup>1</sup> [µg/L]	NG <sup>2</sup> [µg/L]	Kreuzreaktion <sup>3</sup> massenbez. [%]
Atrazin	$4.9 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-9}$	100	1.1	0.25	100
Hydroxyatrazin	$> 1.0 \cdot 10^{-5}$	$> 1 \cdot 10^{-5}$	$< 0.05$	$> 1000$	$> 1000$	$< 0.1$
Desethylatrazin	$3.7 \cdot 10^{-8}$	$7 \cdot 10^{-9}$	11.8	7.0	1.5	13.5
Ametryn	$\approx 3 \cdot 10^{-6}$	$\approx 4 \cdot 10^{-7}$	$\approx 0.15$	$\approx 700$	$\approx 150$	$\approx 0.13$
Atraton	$1.6 \cdot 10^{-7}$	$2.5 \cdot 10^{-8}$	2.84	35	5	2.90
Terbuthylazin	$3.3 \cdot 10^{-9}$	$6 \cdot 10^{-10}$	201	0.72	0.12	189
Terbutryn	$3.8 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-8}$	1.01	92	20	0.901
Simazin	$9.5 \cdot 10^{-9}$	$8 \cdot 10^{-10}$	40.4	1.9	0.15	43.2
Propazin	$7.8 \cdot 10^{-10}$	$1 \cdot 10^{-10}$	490	0.18	0.022	460
Huminsäure <sup>4</sup>	-	-	-	1800	300	-

<sup>1</sup> Testmittelpunkt C (50%-Wert, I<sub>50</sub>, Wendepunkt der 4-parametrischen Gleichung).

<sup>2</sup> Nachweisgrenze, definiert als 15% Inhibition (85%-Wert, graphisch bestimmt).

<sup>3</sup> Die Kreuzreaktionen beziehen sich nicht auf den angegebenen Atrazin-Wert und wurden für jede einzelne Platte neu normiert.

<sup>4</sup> Zum Vergleich: Der robuste Antikörper K1F4 weist einen Testmittelpunkt von C = 110000 µg/L für Huminsäure auf.

Der Antikörper NMI 118 (Tabelle 15) detektiert insbesondere Propazin, Terbuthylazin und Atrazin. Die Differenzierung zwischen diesen Triazinen ist nicht sehr ausgeprägt, es liegt nur ein Faktor 2 zwischen Atrazin und Terbuthylazin. Auch Simazin und desalkylierte Triazine werden noch angezeigt. Es handelt sich hier um einen Antikörper geringerer Spezifität. Dies wäre nicht weiter schlimm, da auch Summentests interessant sein können. Leider ist die Huminsäure-Anfälligkeit so groß, daß er für einen praktischen Einsatz nicht geeignet ist. Von der Empfindlichkeit her gesehen, erreicht dieser Test nur beim (in Deutschland nicht zugelassenen) Propazin das erforderliche Limit von 0.1 µg/L. Daher ist dieser Antikörper nur für spezielle Zwecke brauchbar, ein interessanter Kandidat für hochempfindliche Triazin-Immunoassays scheint er nicht zu sein. Auffallend ist jedoch sein ausgeprägtes Vermögen, Chlorderivate von Thiomethyl-Derivaten zu unterscheiden. Diese Differenzierung macht mindestens den Faktor 200 aus. Insofern ist eine sinnvolle Anwendung in Immunoarrays denkbar.

Tabelle 16: Kreuzreaktionen des mAK NMI 54.

Substanz	C <sup>1</sup> [mol/L]	NG <sup>2</sup> [mol/L]	Kreuz- reaktion <sup>3</sup> molar [%]	C <sup>1</sup> [µg/L]	NG <sup>2</sup> [µg/L]	Kreuzreaktion <sup>3</sup> massenbez. [%]
Atrazin	$1.7 \cdot 10^{-9}$	$2.2 \cdot 10^{-10}$	100	0.36	0.06	100
Hydroxyatrazin	$> 1.0 \cdot 10^{-5}$	$> 1.0 \cdot 10^{-5}$	$< 0.02$	$> 1000$	$> 1000$	$< 0.05$
Desethylatrazin	$7.0 \cdot 10^{-8}$	$1.0 \cdot 10^{-8}$	2.79	13	2	3.21
Ametryn	$\approx 1 \cdot 10^{-4}$	$> 1 \cdot 10^{-5}$	$< 0.01$	$\approx 26000$	$> 1000$	$< 0.05$
Atraton	$5.0 \cdot 10^{-8}$	$6 \cdot 10^{-9}$	3.35	11	1.3	3.42
Terbuthylazin	$8.1 \cdot 10^{-10}$	$1.3 \cdot 10^{-10}$	243	0.19	0.03	228
Terbutryn	$1.1 \cdot 10^{-7}$	$1.3 \cdot 10^{-8}$	1.51	27	3.3	1.35
Simazin	$5.5 \cdot 10^{-9}$	$1.2 \cdot 10^{-9}$	44.3	1.1	0.22	47.4
Propazin	$6.8 \cdot 10^{-10}$	$1.2 \cdot 10^{-10}$	289	0.16	0.027	271
Huminsäure <sup>4</sup>	-	-	-	38600	6000	-

<sup>1</sup> Testmittelpunkt C (50%-Wert, I<sub>50</sub>, Wendepunkt der 4-parametrischen Gleichung).

<sup>2</sup> Nachweisgrenze, definiert als 15% Inhibition (85%-Wert, graphisch bestimmt).

<sup>3</sup> Die Kreuzreaktionen beziehen sich nicht auf den angegebenen Atrazin-Wert und wurden für jede einzelne Platte neu normiert.

<sup>4</sup> Zum Vergleich: Der robuste Antikörper K1F4 weist einen Testmittelpunkt von C = 110000 µg/L für Huminsäure auf.

Antikörper NMI 54 (Tabelle 16) detektiert Propazin am empfindlichsten. Da Propazin in Deutschland nicht zugelassen ist, ist diese Kreuzreaktion für die Praxis wenig bedeutsam. Interessanter ist die Empfindlichkeit gegenüber Terbuthylazin, die dem mAK K1F4 ziemlich genau entspricht. Dagegen ist die Kreuzreaktion gegenüber Atrazin mit 40-50% (relativ zu Terbuthylazin) ungewöhnlich hoch, was eine selektive Messung erschwert, dafür das Summenscreening von Atrazin und Terbuthylazin erlaubt. Auch Simazin wird noch mit einer beträchtlichen Kreuzreaktion detektiert. Die Metaboliten dagegen spielen kaum eine Rolle. Die Huminstoffresistenz könnte besser sein, ist aber nicht so schlecht, daß der Antikörper von vorneherein ausscheiden müßte. Im Trinkwasserbereich ist der Antikörper sicherlich nützlich einzusetzen.

Tabelle 17: Kreuzreaktionen des mAK NMI 21.

Substanz	C <sup>1</sup> [mol/L]	NG <sup>2</sup> [mol/L]	Kreuz- reaktion <sup>3</sup> molar [%]	C <sup>1</sup> [µg/L]	NG <sup>2</sup> [µg/L]	Kreuzreaktion <sup>3</sup> massenbez. [%]
Atrazin	$8.2 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-8}$	1.2	18	4	1.1
Hydroxyatrazin	$1.0 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-10}$	100	0.20	0.05	100
Desethylatrazin	$5.0 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	0.20	94	20	0.21
Ametryn	$1.2 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-8}$	0.83	27	4	0.73
Atraton	$1.1 \cdot 10^{-6}$	$9 \cdot 10^{-8}$	0.09	230	20	0.09
Terbutylazin	$1.2 \cdot 10^{-7}$	$1.3 \cdot 10^{-8}$	0.83	28	3	0.70
Terbutryn	$1.6 \cdot 10^{-8}$	$1.8 \cdot 10^{-9}$	6.3	3.9	0.4	5.1
Simazin	$5.4 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-7}$	0.19	110	22	0.18
Propazin	-	-	-	-	-	-
Huminsäure <sup>4</sup>	-	-	-	43000	8000	-

<sup>1</sup> Testmittelpunkt C (50%-Wert, I<sub>50</sub>, Wendepunkt der 4-parametrischen Gleichung).

<sup>2</sup> Nachweisgrenze, definiert als 15% Inhibition (85%-Wert, graphisch bestimmt).

<sup>3</sup> Die Kreuzreaktionen beziehen sich auf den angegebenen Hydroxyatrazin-Wert und wurden nicht für jede einzelne Platte neu normiert. Es ist daher mit einem erhöhten Fehler zu rechnen.

<sup>4</sup> Zum Vergleich: Der robuste Antikörper K1F4 weist einen Testmittelpunkt von C=110000 µg/L für Huminsäure auf.

Antikörper NMI 21 (Tabelle 17) ist ein "Hydroxyatrazin-Antikörper". Die Kreuzreaktionen anderer Triazine sind gering. Bei dieser vorläufigen Charakterisierung wurde nur ein Hydroxyderivat untersucht, so daß noch eine weitere Differenzierung mit anderen Hydroxymetaboliten notwendig erscheint. Die Störanfälligkeit gegenüber Huminsäure ist mäßig, aber nicht prohibitiv. Die Empfindlichkeit der Hydroxyatrazin-Bestimmung ist ausreichend und entspricht in etwa den besten bisher bekannten monoklonalen Antikörpern. Ein Problem stellt die Suche nach einem geeigneten Tracer dar. Bisher konnte unter den getesteten Tracervarianten kein wirklich guter Tracer gefunden werden. Die Signale sind recht schwach. Sollte man diesen Antikörper für Routinemessungen einsetzen wollen, so müßte man eine optimierte Tracerstruktur suchen.

Tabelle 18: Kreuzreaktionen des mAK NMI 71.

Substanz	C <sup>1</sup> [mol/L]	NG <sup>2</sup> [mol/L]	Kreuz- reaktion <sup>3</sup> molar [%]	C <sup>1</sup> [µg/L]	NG <sup>2</sup> [µg/L]	Kreuzreaktion <sup>3</sup> massenbez. [%]
Atrazin	$1.6 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-8}$	1.2	35	8	1.1
Hydroxyatrazin	$1.9 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-10}$	100	0.38	0.05	100
Desethylatrazin	$1.4 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-7}$	0.14	260	60	0.15
Ametryn	$6.1 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-8}$	0.32	140	20	0.27
Atraton	$1.4 \cdot 10^{-6}$	$2.5 \cdot 10^{-7}$	0.14	300	60	0.13
Terbutylazin	$1.2 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-7}$	0.16	270	80	0.14
Terbutryn	$4.3 \cdot 10^{-8}$	$5 \cdot 10^{-9}$	4.5	10	1.2	3.8
Simazin	$4.2 \cdot 10^{-7}$	$9 \cdot 10^{-8}$	0.46	84	20	0.46
Propazin	$5.7 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7}$	0.34	130	70	0.30
Huminsäure <sup>4</sup>	-	-	-	190000	20000	-

<sup>1</sup> Testmittelpunkt C (50%-Wert, I<sub>50</sub>, Wendepunkt der 4-parametrischen Gleichung).

<sup>2</sup> Nachweisgrenze, definiert als 15% Inhibition (85%-Wert, graphisch bestimmt).

<sup>3</sup> Die Kreuzreaktionen beziehen sich auf den angegebenen Hydroxyatrazin-Wert und wurden nicht für jede einzelne Platte neu normiert. Es ist daher mit einem erhöhten Fehler zu rechnen.

<sup>4</sup> Zum Vergleich: Der robuste Antikörper K1F4 weist einen Testmittelpunkt von C=110000 µg/L für Huminsäure auf.

Der Hydroxyatrazin-Antikörper NMI 71 (Tabelle 18) weist große Ähnlichkeit zu NMI 21 auf. Die Kreuzreaktionen sind weitgehend vergleichbar, die Empfindlichkeit etwas geringer als bei Antikörper 21, was aber nicht unbedingt signifikant sein muß. Besonders interessant ist die hohe Huminstoffresistenz. Daher sollte dieser Antikörper gleichfalls genauer untersucht werden. Sollte die Empfindlichkeit ausreichen, so könnte hier ein robuster Antikörper für Routinemessungen zur Verfügung stehen. Auch hier ist die Frage der optimalen Tracerstruktur noch nicht endgültig geklärt.

#### 5.4 Schlußfolgerungen

Durch die dargestellten Techniken lassen sich in verhältnismäßig kurzer Zeit und mit mäßigem Aufwand monoklonale Antikörper gewinnen, selektieren und charakterisieren. Die Screeningausbeute ist im Vergleich zu bisher publizierten Verfahren exzellent. Die Verwendung eines Multi-Hapten-Tracers hat sich in vollem Umfang bewährt, wogegen ein Multi-Hapten-Immunogen keine hervorstechenden Vorteile bietet. Aus den Tracer-Bindungsprofilen kann

sogar vermutet werden, daß nur ein einziges Hapten ursächlich für die Induzierung aller bisher aufgefundenen Antikörper verantwortlich ist. Zudem wird die Erkennung von Struktur-Wirkungsbeziehungen durch Verwendung eines gemischten Immunogens erschwert.

Das frühzeitige Screening nach Eigenschaften, die die Eignung eines Antikörpers prinzipiell in Frage stellen können (z.B. Huminsäure-Störanfälligkeit), kann verhindern, daß aufwendige Charakterisierungen an letztlich ungeeigneten Antikörpern durchgeführt werden. Die Reihenfolge der Screeningschritte sollte daher nach der Wahrscheinlichkeit der Eliminierung eines Klons gewählt werden.

## **6 Synthesen von Immunoassay-Komponenten**

### **6.1 Synthese von Triazin-Derivaten**

Die detaillierten Synthesevorschriften sind im Experimentellen Teil aufgeführt. Allgemein kann gesagt werden, daß die unterschiedlichen Vorschriften eine Entwicklung und zahlreiche Verbesserungen dokumentieren. Da nur in wenigen Fällen die identische Substanz erneut hergestellt wurde, sind alle Vorschriften angegeben, die zu einer verwendbaren Substanz geführt haben. Verwendbar soll bedeuten, daß keineswegs von allen geeigneten Triazinen auch korrespondierende Tracer hergestellt wurden. Die gelegentlich relativ niedrigen Ausbeuten sind darauf zurückzuführen, daß kaum Optimierungsbemühungen in Richtung Ausbeute gemacht wurden, sondern eher in Richtung Reinheit. So wurde manchmal zugunsten besserer Trennbarkeit auf einen quasi-vollständigen Umsatz verzichtet, da oft mit der Reaktionsdauer auch die Anzahl und Menge der Nebenprodukte ansteigt. Daher wurde oft auch nur die Ausbeute bezüglich der ersten Fraktion bestimmt, da die restliche Substanz nicht isoliert wurde.

### **6.2 Aktivierung von Triazin-Carbonsäuren**

Die Aktivierung wird im Experimentellen Teil nicht getrennt aufgeführt, weil sie immer im Zusammenhang mit einer Kopplung steht. Da eine reproduzierbare Aktivierung entscheidend für das Gelingen von Tracer-Synthesen ist, wurden einige unterschiedliche Methoden erprobt und eine breit anwendbare NHS-Ester-Methode optimiert [446]. Obwohl es sehr viele Möglichkeiten gibt, ein Molekül zu aktivieren bzw. zu einer kovalenten Kopplung zu befähigen, erscheint doch die Route Carbonsäure - aktivierter Ester - Amid besonders attraktiv. So ist die Synthese von Carbonsäuren aller Art gut nach Standardprozeduren durchzuführen, die Reinigung von Carbonsäuren ist meistens problemlos und die Aktivierung ist sehr zuverlässig. Obwohl die Aktivierungs- und Kopplungsausbeuten möglicherweise nicht optimal sind, tut dies der Gesamtmethode keinen Abbruch.

### 6.3 Kopplung von Haptenen an Peroxidase

Meerrettichperoxidase besitzt im ELISA einen hohen Stellenwert. Die Vorteile wie hohe Aktivität und Reinheit, günstiger Preis, weit überdurchschnittliche Stabilität usw. wurden schon von vielen Autoren erkannt. Wenig verbreitet ist dagegen die Kenntnis über die Bedeutung der Kopplungsdichte und der Zusammenhang zur Peroxidase. Völlig untypischerweise hat Meerrettichperoxidase nur 1-3 derivatisierbare Aminogruppen. Durch diesen seltenen Glücksfall kommt man bei Tracersynthesen einer chemisch definierten Derivatisierung sehr nahe.

Dagegen entstehen bei vielen aktivierbaren Aminogruppen zwangsläufig statistische Gemische. Eine quantitative Derivatisierung ist bei anderen Enzymen meist nicht möglich, da bei hohen Kopplungsdichten zunehmend Desaktivierung, Denaturierung und Präzipitation auftreten. Zudem wird bei hohen Kopplungsdichten eine multivalente Bindung der Tracer vorherrschend. Da die Affinität des Tracers im multivalenten Zustand wesentlich höher ist als im monovalenten Zustand, treten Empfindlichkeitsprobleme auf. In einigen Publikationen wird explizit oder implizit ein Zusammenhang zwischen Testempfindlichkeit und Enzym-Label hergestellt. In den meisten Fällen dürfte es sich hier um ein Artefakt der Kopplungsdichte handeln. Es läßt sich sonst kaum begründen, wieso Immunoassays mit Enzymtracern ähnlicher Label-Nachweisgrenze deutlich unterschiedliche Analyt-Nachweisgrenzen aufweisen.

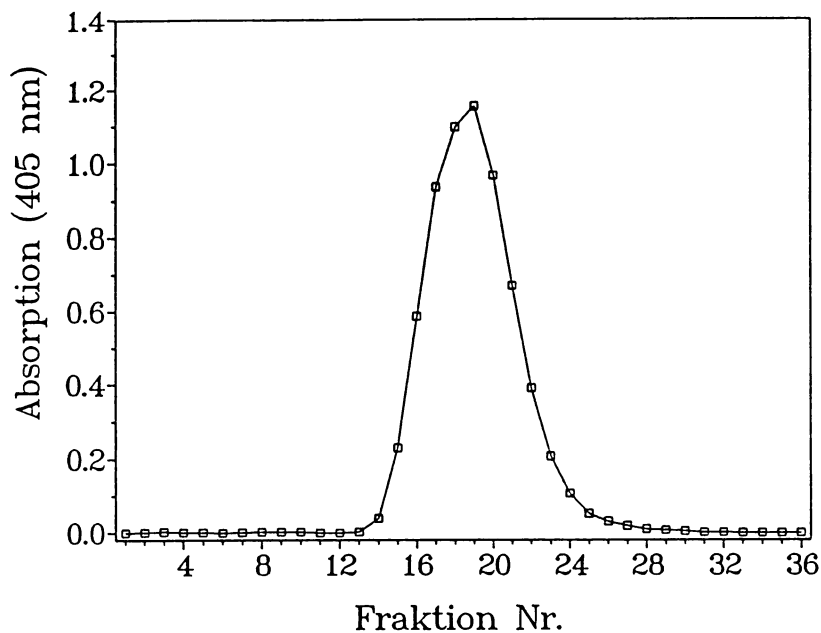
Im Falle der Peroxidase kann ein fast beliebiger Überschuß an Kopplungsreagenz eingesetzt werden. Vorausgesetzt man hat ein sauberes Hapten-Derivat zur Verfügung, ist es sehr wahrscheinlich, daß man ein weitgehend quantitativ und einheitlich derivatisiertes Enzym erhält.

### 6.4 Reinigung von Enzymtracern

Die wahrscheinlich am häufigsten angewendete Methode zur Reinigung von Enzymkonjugaten ist die Dialyse. Nachteilig ist die lange Dauer dieser Prozedur. Dies kann sich negativ auf die Aktivität von empfindlichen Proteinen auswirken. Es wurde getestet, ob die in diesem Labor üblicherweise verwendete Gelchromatographie noch Spuren des ungekoppelten Haptens zurückläßt. Hierzu wurde der Peroxidasetracer zusätzlich einer Dialyse unterworfen. Die Atrazin-Eichkurven zeigten keine Verbesserung des Testmittelpunkts (Daten nicht dargestellt). Daraus kann gefolgert werden, daß Gelchromatographie auf Sephadex PD-10-Säulen absolut adäquat ist und keine weiteren Reinigungsschritte mehr erfordert. Es konnte nicht belegt werden, daß Dialyse effektiver als Gelchromatographie sei; im Gegenteil, es kann sogar vermutet werden, daß gelchromatographisch gereinigte Tracer weniger Verunreinigungen aufweisen als dialysierte. Gelchromatographie weist erhebliche praktische Vorteile gegenüber der Dialyse auf. Der reproduzierbare Verlauf gibt einen hohen Grad an Sicherheit, ein sauberes Konjugat zu erhalten. Zudem dauert die Chromatographie mit Fertigsäulen nur

ca. 1 Stunde (incl. Vorbereitung und Äquilibration), eine Dialyse dauert bei hohen Reinheitsanforderungen viele Tage.

In Abb. 113 ist der typische Verlauf einer Gelchromatographie mit einer Sephadex PD-10-Säule [447] anhand der Absorptionen (405 nm) einer Mikrotiterplatte dargestellt, in der die Fraktionen aufgefangen wurden. Da ELISA-Reader üblicherweise mit Filtern und nicht mit Monochromatoren arbeiten, mußte von 403 auf 405 nm ausgewichen werden. Das Eluat wurde in Portionen von 4 Tropfen pro Kavität aufgefangen. Werden bei mehreren gelchromatographischen Läufen gleiche Volumina verwendet, so ist die Lage des Peaks gut reproduzierbar, was sich im Falle von nicht im sichtbaren Bereich absorbierenden Konjugaten (z.B. Alkalische Phosphatase) mit Vorteil nutzen läßt. Es ist günstig, an der abfallenden Flanke einen willkürlichen Schnitt zu setzen. Die positiven Fraktionen vor diesem Schnitt werden zu einer Hauptfraktion gepoolt, die nachfolgenden zu einer Nebenfraktion. Dies ist sinnvoll, da der Durchbruch von Verunreinigungen bei höheren Fraktionsnummern zu erwarten ist. Diese Methode der Tracerreinigung ist gut optimiert und als Routine-Methode geeignet.



*Abb. 113: Gelchromatographie eines Peroxidase-Tracers. Konditionierung mit 200 mL PBS, Probe: 0,5 mL Konjugat, Elution mit PBS, RT, Fraktionierung: 4 Tropfen pro Kavität.*

### 6.5 Kopplung von Haptenen an Carrier-Moleküle

Die Kopplung von Haptenen an polymere Carrier unterscheidet sich prinzipiell kaum von der Kopplung an Enzyme. Erleichternd ist jedoch die Tatsache, daß oft unter weniger milden Bedingungen gearbeitet werden kann. So können höhere Konzentrationen Lösungsmittel, extremere pH-Werte, höhere Temperaturen und aggressivere Reagenzien angewendet werden. Noch wichtiger ist die Möglichkeit andere Reinigungsprozeduren einzusetzen. Enzyme

allgemein sollten, um die Enzymaktivität zu erhalten, schnell und bei niedrigen Temperaturen gereinigt werden. Carrierkonjugate dagegen kann man tagelang bei Raumtemperatur dialysieren, durch hohe Salzkonzentrationen oder Lösungsmittel präzipitieren bzw. einer Ultrafiltration unterziehen. Diese Methoden lassen sich im Gegensatz zur Gelchromatographie auch mit größeren Substanzmengen durchzuführen.

## 6.6 Synthese von hydrophilen Spacern

Die Synthese von hydrophilen Spacern ist insofern schwierig, da entsprechende heterobisfunktionelle Vorstufen nicht erhältlich sind. Homopolymere von Aminosäuren würden sogar als heterobisfunktionell gelten können, sie sind leider sehr teuer und als allgemeiner Startpunkt einer Haptensynthese daher nicht geeignet.

Homobisfunktionelle Vorstufen sind viel leichter zugänglich. So kommen Oligoethylenglycole, Oligosaccharide, Polyethylenglycoldisäure und ähnliche Stoffe in Frage. Synthetisch ergibt sich die Problematik, daß bei einer Umsetzung mit diesen Chemikalien immer ein statistisches Gemisch aus Edukt, Mono-Derivat und Bis-Derivat entsteht. Bei langgestreckten Molekülen ist mit einem kooperativen Verhalten (d.h. daß bevorzugt Mono-Produkt entsteht) nicht zu rechnen. Erschwerend kommt hinzu, daß die Trennung von hydrophilen Produkten allgemein sehr schwierig ist. Mindestens zwei der Produkte ähneln sich in ihren physikochemischen Eigenschaften so sehr, daß auch chromatographische Trennungen nur mit Einschränkungen verwendbar sind. Verschiedene Vorversuche sind an der Trennungsfrage gescheitert.

Daher wurde eine Schutzgruppentechnik getestet, die den Charakter des geschützten Amins stark verändert. Die Trityl-Schutzgruppe [448][449] führt durch ihre Phenylreste einen stark hydrophoben Teil in das Molekül ein. Das leicht erhältliche 2,2'-(Ethylendioxy)-diethylamin kann als einfacher Vertreter einer homologen Reihe von Diaminen gelten, die sich von Oligomeren des Ethylenglycols ableiten. Wird dieses Diamin in großem Überschuß (gelöst in Glyme) mit Tritylchlorid umgesetzt (Abb. 114), so bildet sich nach mehrstündigem Erhitzen in sehr guter Ausbeute das mono-geschützte Amin. Eine zusätzliche Base ist nicht erforderlich, da diese Funktion auch von dem im Überschuß vorhandenen Amin übernommen wird. Das Produktgemisch kann sehr leicht wässrig aufgearbeitet werden: Nach Ausschütteln mit MTBE fällt das Mono-Produkt in einem Schritt fast völlig rein an. Dieses Schlüsselprodukt kann nun mit allen erdenklichen Reagenzien weiter umgesetzt werden und ist augenscheinlich gut lagerfähig. In dieser Arbeit wurde besonders die Umsetzung mit cyclischen Carbonsäureanhydriden angewendet. Neben Bernsteinsäureanhydrid oder Glutarsäureanhydrid ist Diglycolsäureanhydrid ein besonders interessantes Reagenz. Daß letzteres nur in technischen Reinheiten erhältlich ist, ist in diesem Zusammenhang von geringerer Bedeutung. Das monogeschützte Amin wird nun in Glyme gelöst und mit dem Anhydrid versetzt. Zusätzlich wird eine Base wie Triethylamin zugegeben. Kurzes Erhitzen ergibt ein öliges Produkt. Als letzter Schritt muß noch die Schutzgruppe abgespalten werden: Dies ist



nicht ganz unkritisch und sollte unter laufender analytischer (DC) Kontrolle ablaufen. Die Abspaltung erfolgt in reinem Eisessig bei erhöhter Temperatur. Eine wässrige Aufarbeitung erleichtert die Abtrennung des Tritylderivats. Das Produkt befindet sich in der Wasserphase und muß nicht unbedingt isoliert werden. Gefriertrocknung wäre wohl die schonendste Methode.

Diese exemplarisch durchgeführte Methode läßt sich wahrscheinlich leicht auf höhere Homologe des Diamins übertragen, sofern man sie in der erforderlichen Reinheit bekommen kann. Es ist denkbar, daß durch den Einsatz längerer Derivatisierungsreagenzien auf recht einfache Weise extrem lange Spacer zugänglich werden. Und dies im Gegensatz zu durch Polymerisation gewonnenen Substanzen nicht mit einer mehr oder weniger breiten Molekulargewichtsverteilung, sondern als chemisch eindeutig definierte Reinsubstanz. Nicht nur in der Immunologie, auch im Bereich der Supramolekularen Chemie könnten derartige (gut zugängliche) Derivate auf Interesse stoßen [450]. Die volle Anwendungsbreite solcher Substanzen ist im Moment kaum zu beurteilen.

Dies zeigt sich auch an einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von EBATO et al. [451]. Die Autoren verwendeten eine analoge Spacereinheit für die Untersuchung der Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung. Sie konnten zeigen, daß die Biotin-Streptavidin-Bindung durch den hydrophilen Spacer erheblich verbessert wird. Die publizierte Synthese ist jedoch augenscheinlich nicht zur Gewinnung des underivatisierten Spacers geeignet. Zudem erfordert sie aufwendige chromatographische Reinigungsschritte.

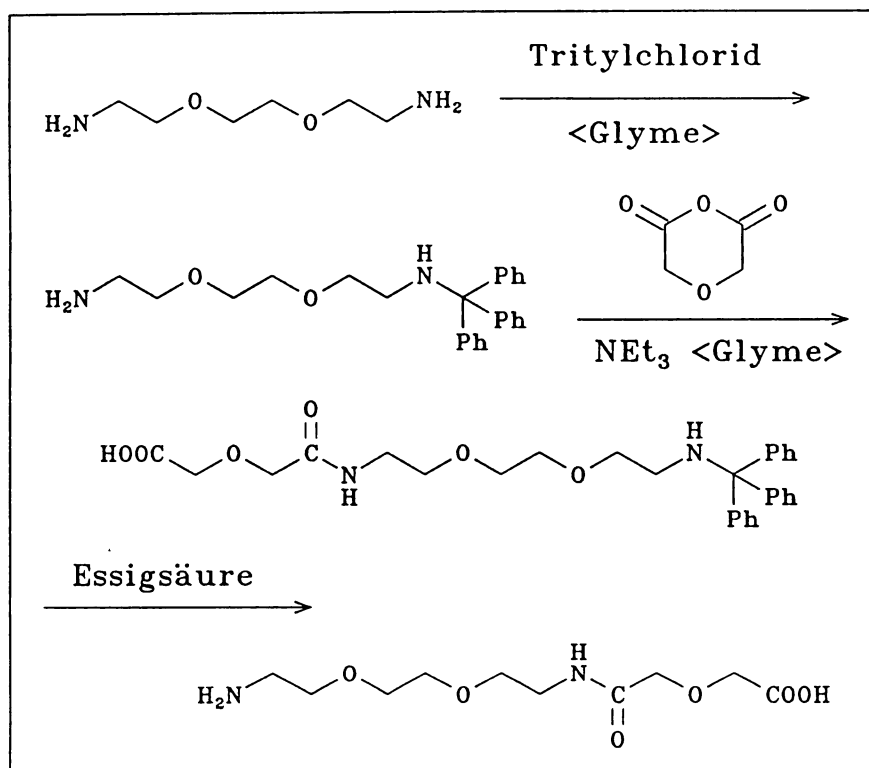


Abb. 114: Synthese eines hydrophilen, heterobifunktionellen Spacers.

## 6.7 Schlußfolgerungen

Die Synthese von Triazinderivaten konnte soweit perfektioniert werden, daß Vorschriften für Haptene mit unterschiedlichsten funktionellen Gruppen zur Verfügung stehen. Es konnten im Rahmen dieser Arbeit zahlreiche Triazine hergestellt werden, die zur Ermittlung von Struktur-Wirkungsbeziehungen, zur Untersuchung von mechanistischen Details in Immunoassays und zur Optimierung der Triazin-Immunoassays durch neue Enzymtracer-Varianten eingesetzt wurden. Durch diese Derivate waren Untersuchungen möglich, die bisher in diesem Umfang und in dieser Breite mit keinem Pestizid durchgeführt wurden.

Die Aktivierung der Carbonsäurederivate, bisher ein unsicheres Unterfangen, konnte so optimiert werden, daß praktisch jede Carbonsäure reproduzierbar an ein Enzym bzw. Protein gekoppelt werden kann. Die Kopplung an sich ist kein Problem, sofern man die Synthese der NHS-Ester (Aktivierung) beherrscht und keine extrem schwerlöslichen Substanzen verwendet werden.

Die Synthese eines hydrophilen Spacers zeigt neue Wege auf, die Präsentation von Haptenen noch weiter zu verbessern und damit sowohl die Herstellung von hochaffinen Antikörpern, als auch die Synthese stark bindender Tracerderivate zu erleichtern. Durch die aufgezeigte Syntheseroute dürften diese Derivate leicht und preisgünstig zugänglich werden und somit für viele, auch nicht mit der Immunologie verbundene Anwendungsbereiche attraktiv werden.

## 7 Sonstige Ergebnisse

### 7.1 Eichkurven diverser Triazin-ELISAs

Hier sollen in einem Zusammenhang mehrere ELISA-Eichkurven abgebildet werden, um den "Stand der Technik" zu dokumentieren. Es handelt sich nicht unbedingt um die empfindlichsten Eichkurven, eher um repräsentative. Es werden Nachweisgrenzen und Informationen zur Reproduzierbarkeit der Eichpunkte angegeben.

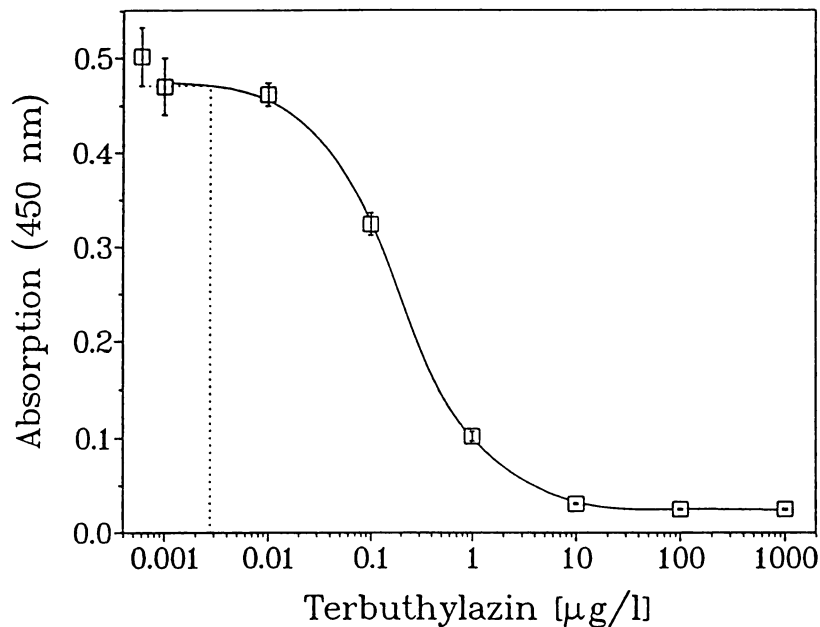
Als Nachweisgrenze wird hier der Schnittpunkt des Nullwertes minus 3 Standardabweichungen mit der Eichkurve definiert. Die Eichpunkte sind Mediane von Triplikaten ( $n=3$ ), die Fehlerbalken entsprechen der Spannweite<sup>20</sup>, was in guter Näherung zwei Standardabweichungen entspricht. Mediane wurden verwendet, um die Anwendung von zweifelhaften Ausreißertests zu umgehen. Die experimentellen Daten sind etwas ausführlicher als üblich dargestellt.

In Abb. 115 ist ein ELISA mit dem monoklonalen Antikörper K1F4 dargestellt, der primär zur Bestimmung von Terbutylazin verwendbar ist. Positiv an diesem Test ist die hohe

---

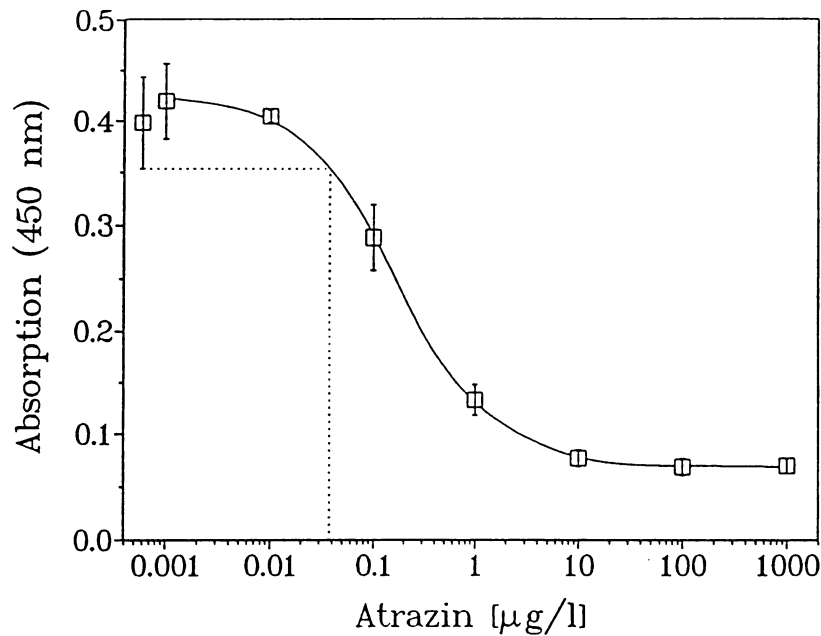
<sup>20</sup> Siehe GLOSSAR.

Stabilität der Testparameter, die Huminsäureresistenz und die meist sehr gute Reproduzierbarkeit. Die Empfindlichkeit und Selektivität könnte für bestimmte Anwendungen noch besser sein, trotzdem kann die hier dargestellte, optimierte Konfiguration für die Trinkwasserüberwachung oder ähnliche Aufgaben erfolgreich eingesetzt werden.



**Abb. 115: Terbuthylazin-Test (KIF4).** Antikörper: mAK KIF4 1:20.000, 200  $\mu\text{L}$ , ca. 18 h, RT, Waschen, Vorinkubation: 200  $\mu\text{L}$  Terbuthylazin (Wasser), 60 min, RT, Tracer: 100  $\mu\text{L}$  t-Bu/Et/C6-Tracer, 1:30.000, 7 min, Waschen, Entwicklung: 200  $\mu\text{L}$  Substratlösung (20 ml Substratpuffer, 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (1%), 200  $\mu\text{L}$  TMB-Stammlösung (DMSO), 5 min, Abstoppen: 100  $\mu\text{L}$  5%ige  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Messung bei 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm, NG=0.003  $\mu\text{g/L}$ , Parameter: A=0.515, D=0.024, C=0.175, B=0.986, r=0.99999.

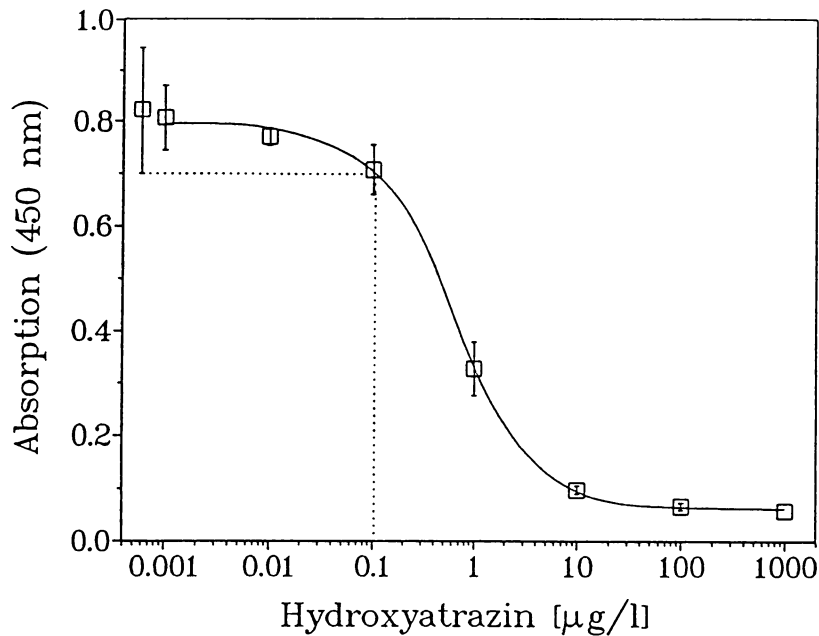
Bemerkenswert an der Kurve der Abb. 116 ist, daß der Original-Test [187] mit einer indirekten Konfiguration aufgebaut worden war. Der Testmittelpunkt für Atrazin lag bei 0.45  $\mu\text{g/L}$ , eigentlich zu hoch, um den Trinkwasser-Grenzwert von 0.1  $\mu\text{g/L}$  sicher zu erfassen. In der hier optimierten (direkten) Version liegt der Testmittelpunkt fast um den Faktor 4 niedriger. Der Test ist in dieser Form (bezüglich der Empfindlichkeit) hervorragend geeignet, Überschreitungen des Trinkwasser-Grenzwertes zu detektieren.



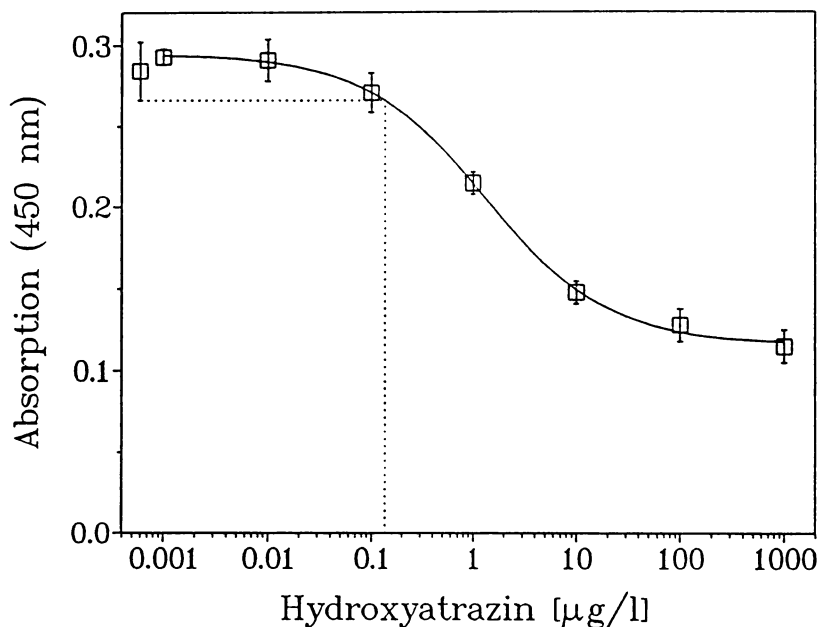
**Abb. 116: Atrazin-Test (Ciba 21-1).** Antikörper: mAK Ciba 21-1 1:20.000, 200 µL, 48 h, RT, Waschen, Vorinkubation: 200 µL Atrazin (Wasser), 30 min, RT, Tracer: 100 µL i-Pr/Cl/C6-Tracer, 1:10.000, 10 min, Waschen, Entwicklung: 200 µL Substratlösung (20 ml Substratpuffer, 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (1%), 200 µL TMB-Stammlösung (DMSO), 35 min, Abstoppen: 100 µL 5%ige H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Messung bei 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm, NG=0.038 µg/L, Parameter: A=0.788, D=0.064, C=0.118, B=0.797, r=0.9998.

Auch beim Hydroxyatrazin-Test, dargestellt in Abb. 117, konnte durch eine Änderung der Testkonfiguration eine Verbesserung des Testmittelpunkts erreicht werden. Von SCHLAEPPI et al. [187] wurde ein Testmittelpunkt von 0.95 µg/L erreicht. Bei dem hier vorgestellten Test liegt der Testmittelpunkt bei rund 0.6 µg/L, auch etwas niedrigere Werte konnten erzielt werden.

Der Hydroxyatrazin-Test (S84) in Abb. 118 wird nicht gezeigt, weil er in dieser Form sinnvoll in der Praxis eingesetzt werden könnte. Die Eichkurve besitzt einen erheblichen "Sockel" (Verunreinigungen im Tracer bzw. Antikörper) und das Signal ist nicht sehr hoch. Der Clou bei diesem Test liegt darin, daß das Serum S84 ein Atrazin-Serum und kein Hydroxyatrazin-Serum ist. Damit soll gezeigt werden, daß bei einer Immunisierung auch Antikörper gegen Metaboliten auftreten können und daß man die Spezifität eines (polyklonalen) Tests einfach durch Wechsel des Tracers umschalten kann.

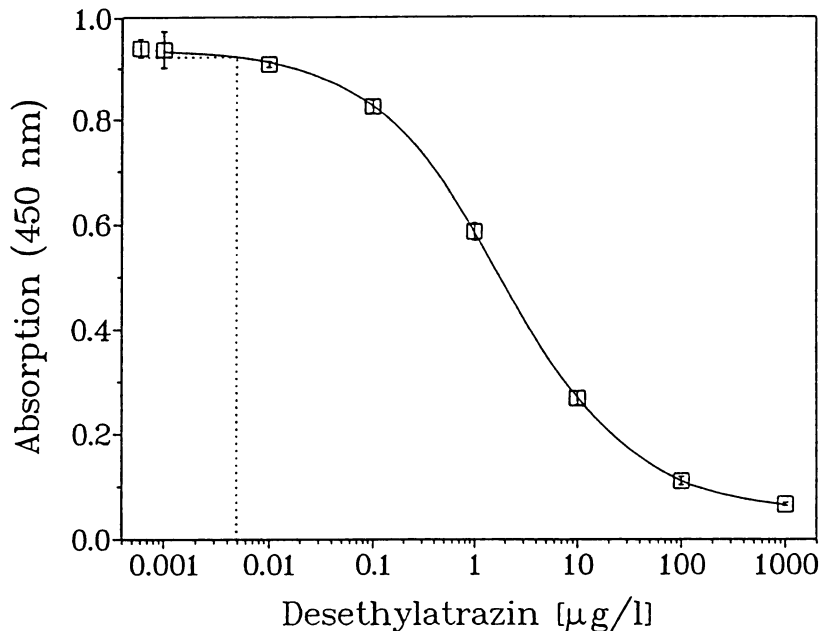


**Abb. 117: Hydroxyatrazin-Test (Ciba 85-3).** Antikörper: mAK Ciba 85-3 1:20.000, 200  $\mu\text{L}$ , 24 h, RT, Waschen, Vorinkubation: 200  $\mu\text{L}$  Hydroxyatrazin (Wasser), 150 min, RT, Tracer: 100  $\mu\text{L}$  i-Pr/OH/C6-Tracer, 1:10.000, 10 min, Waschen, Entwicklung: 200  $\mu\text{L}$  Substratlösung (20 ml Substratpuffer, 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (1%), 200  $\mu\text{L}$  TMB-Stammlösung (DMSO), 35 min, Abstoppen: 100  $\mu\text{L}$  5%ige  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Messung bei 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm, NG=0.105  $\mu\text{g/L}$  Parameter: A=0.796, D=0.062, C=0.601, B=1.090, r=0.9997.



**Abb. 118: Hydroxyatrazin-Test (S84).** Antikörper: pAK S84 (Schaf) 1:20.000, 200  $\mu\text{L}$ , 24 h, RT, Waschen, Vorinkubation: 200  $\mu\text{L}$  Hydroxyatrazin (Wasser), 60 min, RT, Tracer: 100  $\mu\text{L}$  i-Pr/OH/C6-Tracer, 1:10.000, 10 min, Waschen, Entwicklung: 200  $\mu\text{L}$  Substratlösung (20 ml Substratpuffer, 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (1%), 200  $\mu\text{L}$  TMB-Stammlösung (DMSO), 30 min, Abstoppen: 100  $\mu\text{L}$  5%ige  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Messung bei 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm, NG=0.136  $\mu\text{g/L}$ , Parameter: A=0.295, D=0.117, C=1.315, B=0.729, r=0.9996.

Zum Test mit dem polyklonalen Antikörper C10 (Abb. 119) ist zu sagen, daß hier eine weitgehend unoptimierte Kurve gezeigt wird. Der Testmittelpunkt ist daher relativ hoch. Die Antikörper und die Tracerkonzentration könnten noch erheblich vermindert werden, was man an der extrem kurzen Entwicklungszeit von nur 2 min erkennt.



**Abb. 119: Desethylatrazin-Test (C10).** Antikörper: pAK C10 (Kaninchen) 1:10.000, 200  $\mu\text{L}$ , 48 h, RT, Waschen, Vorinkubation: 200  $\mu\text{L}$  Desethylatrazin (Wasser), 90 min, RT, Tracer: 100  $\mu\text{L}$  H/Cl/C6-Tracer, 1:40.000, 20 min, Waschen, Entwicklung: 200  $\mu\text{L}$  Substratlösung (20 ml Substratpuffer, 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (1%), 200  $\mu\text{L}$  TMB-Stammlösung (DMSO), 2 min (!), Abstoppen: 100  $\mu\text{L}$  5%ige  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Messung bei 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm, NG=0.005  $\mu\text{g/L}$ , Parameter: A=0.940, D=0.053, C=1.850, B=0.665, r=0.99997.

Allgemein muß zu den in diesem Abschnitt gezeigten Tests bemerkt werden, daß die Vorinkubationszeiten meist unnötig lang gewählt waren. Es reichen in der Regel 5 bis 10 min. Zudem soll nicht behauptet werden, die angegebenen Testbedingungen würden ein Optimum darstellen. Nicht selten ist offensichtlich, wo noch Verbesserungen nötig und möglich sind. Die Angaben sollen dazu dienen, Anhaltspunkte für die Durchführung dieser oder ähnlicher Tests zu liefern. Zu der angegebenen Nachweisgrenze muß angemerkt werden, daß die o.g. Definition sehr empfindlich auf die Standardabweichung und den Mittelwert des Nullwerts reagiert. Es kann folglich mit einer identischen Testkonfiguration eine sehr unterschiedliche Nachweisgrenze erhalten werden. Daher wurde zusätzlich der Parameter C der 4-parametrischen Gleichung angegeben, der konstantere Werte liefert. Weitere Kurven z.B. von C193 und S84 finden sich in anderen Teilen der Arbeit.

## 7.2 Absorption (403 nm) verschiedener Tracer

Die Bestimmung der Tracerkonzentration kann näherungsweise über den Absorptionskoeffizienten bei 403 nm (Soret-Bande) erfolgen. Um verschiedene Präparationen vergleichen zu können, wurde die Absorption einiger Triazintracer vermessen. Hierzu war ein Verdünnungsschritt 1:10 erforderlich, der mit einer Mischung aus PBS, 1 g/L BSA und 0.1 g/L Sorbinsäure durchgeführt wurde. Dieser Verdünnungspuffer hatte eine Absorption (403 nm) von 0.007 Einheiten relativ zu Wasser.

- a) Tracer W-TRAC70\* (t-Bu/Et/C6) 1:10 in PBS  
 $A_{403\text{nm}} = 0.347 \pm 0.01$  (n=4)  
Nach AIBARA [85] ist für Peroxidase  $\epsilon_{403} = 1.02 \cdot 10^5$  L/(mol·cm).  
Daraus folgt:  
[t-Bu/Et/C6-Tracer] =  $3.4 \cdot 10^{-6}$  mol/L (1:10)
- b) Tracer W-T014A\* (i-Pr/Cl/C6) 1:10 in PBS  
 $A_{403\text{nm}} = 0.440 \pm 0.002$  (n=4)  
Mit  $\epsilon_{403} = 1.02 \cdot 10^5$  L/(mol·cm) für Peroxidase folgt daraus:  
[i-Pr/Cl/C6-Tracer] =  $4.3 \cdot 10^{-6}$  mol/L (1:10)
- c) Tracer W-T100A\* (t-Bu/Et/C6) 1:10 in PBS  
 $A_{403\text{nm}} = 0.908 \pm 0.007$  (n=3)  
Mit  $\epsilon_{403} = 1.02 \cdot 10^5$  L/(mol·cm) für Peroxidase ergibt sich:  
[t-Bu/Et/C6-Tracer] =  $8.9 \cdot 10^{-6}$  mol/L (1:10)

\* Interne Bezeichnung.

## 7.3 Enzymaktivität verschiedener Tracer

Für bestimmte Anwendungen ist es nicht in erster Linie interessant, die Gesamtkonzentration des Tracers zu bestimmen, sondern die relative Konzentration des tatsächlich aktiven Tracers (bzw. Enzyms). Es hat sich gezeigt, daß es technisch sogar einfacher ist, Enzymaktivitäten zu messen, als die Absorptionen kleiner Tracermengen (Tabelle 19).

**Tabelle 19: Peroxidase-Tracer (Charakterisierung).**

Name	Absorption <sup>1</sup> (403 nm)	10 <sup>-6</sup> [mol/L] (aus Abs. <sup>2</sup> )	Enzymaktivität <sup>3</sup> [mAbs/min]
Peroxidase POD	1.447	14.2	-
i-Pr/Cl/EDA-DGS	0.663	6.50	27.6
t-Bu/Et/C6 (Mono)	0.633	6.21	33.6
i-Pr/Cl/C11	0.219	2.15	7.5
Et/Cl/C6	0.211	2.07	2.6
t-Bu/Cl/C6	0.345	3.38	8.6
c-Pentyl/Cl/C6	0.202	1.98	3.5
c-Pr/Cl/C6	0.245	2.40	4.4
i-Pr/Cl/C6-C6	0.143	1.40	2.4
i-Pr/Cl/C6-C2	0.119	1.17	3.7
i-Pr/Et/C6	0.183	1.79	4.4
i-Pr/SMe/C6	0.152	1.49	3.4
t-Bu/Et/3MPS	0.235	2.30	7.4
i-Pr/Et/3MPS	0.229	2.25	7.0
MIX10	0.513	5.03	22.2
i-Pr/Cl/C3	0.242	2.37	3.7
i-Pr/OH/C6	0.336	3.29	13.8
H/Cl/C6	0.668	6.55	38.3
t-Bu/Et/C6	0.694	6.80	42.8
i-Pr/Cl/C6	0.398	3.90	10.4

<sup>1</sup> Soret-Bande<sup>2</sup> Nach AIBARA (siehe S. 227)<sup>3</sup> Mit Tetramethylbenzidin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (siehe S. 128, 255)



#### 7.4 Tests zur Stabilisierung von Peroxidase-Tracern

Es sind zahllose Methoden zur Stabilisierung von Enzymen veröffentlicht worden [452]. Leider fehlt es bis heute an einer allgemein anwendbaren Strategie zur wirksamen Verhinderung von Denaturierungsprozessen. Es ist daher nicht zu umgehen, den stabilisierenden Einfluß von Additiven rein empirisch zu ermitteln.

In einer ersten Testreihe wurden einige Zusätze und Puffer getestet. Hierzu wurde ein Peroxidase-Tracer (i-Pr/Cl/C6) 200.000fach in dem angegebenen Puffer verdünnt und gegebenenfalls mit einem Zusatzstoff versetzt. Nach 7 Tagen bei Raumtemperatur und normaler Beleuchtung wurde die Enzymaktivität nochmals vermessen.

Von den hier untersuchten Stoffen haben BSA, Häm und Tween 20 einen signifikanten Stabilisierungseffekt. Die Halbwertszeit der Enzymaktivität liegt mit diesen Zusätzen bei ca. 7 Tagen. Zudem kann gezeigt werden, daß der verwendete Citratpuffer (pH 3.7) zwar eine gute enzymatische Aktivität ermöglicht, die Langzeitstabilität wird jedoch drastisch vermindert. Schon nach 24 Stunden läßt sich kaum mehr eine Aktivität nachweisen. Dieser Effekt muß bei Experimenten in sauren Puffern unbedingt berücksichtigt werden. Es sollte zudem untersucht werden, ob ein etwas höherer pH-Wert (4-5) einen besseren Kompromiß zwischen Enzymaktivität und Stabilität darstellt. Es kann auch gezeigt werden, daß Kalium-sorbat keinen, und EDTA nur einen geringen hemmenden Einfluß auf Peroxidase-Tracer hat.

Somit ist Kaliumsorbit für Konservierungszwecke gut geeignet. Auch EDTA kann kurzfristig zur Komplexbildung unerwünschter Ionen herangezogen werden. Dagegen verursachte Merthiolat (Thimerosal) eine drastische Hemmung der Peroxidase. Dies sollte trotz der häufigen Anwendung zur Konservierung von ELISA-Komponenten zur Vorsicht mahnen. Vermutlich ist Thimerosal nur in extremen Verdünnungen mit POD verträglich, eventuell spielt auch die Reinheit (freie Quecksilberionen?) eine Rolle. Glutathion scheint als Zusatz ungeeignet; für Calcium konnte keine signifikante Stabilisierungswirkung nachgewiesen werden, obwohl in der Literatur mehrfach über Peroxidase-Calcium-Wechselwirkungen berichtet wurde.

In einer detaillierteren zweiten Meßreihe wurden weitere Zusatzstoffe untersucht. Neben BSA, Häm und Tween 20 konnten auch für Triton X-100 und ein wasserlösliches kationisches Polymer gewisse Stabilisierungseffekte nachgewiesen werden. Zusätze wie Polyvinylalkohol, Sorbit oder Glycerin scheinen dagegen nicht sinnvoll.

**Tabelle 20: Stabilisierung von Peroxidase-Tracern (I).**

Basis <sup>1</sup>	Zusatz	Konzentration	Aktivität [%] <sup>2</sup>
PBS (pH 7.6)	-	-	22.6
Wasser (Gräntzel)	-	-	6.0
PBS	BSA	5 g/L	57.2
PBS	Häm	10 mg/L	54.6
PBS	Merthiolat	ca. 50 mg/L	0.0
PBS	Glutathion (red.)	5 g/L	0.0
PBS	Kaliumsorbit	1 g/L	25.8
PBS	Tween 20	ca. 2.5 g/L	46.8
PBS	EDTA	2.5 g/L	6.0
PBS	Natriumsulfat	42.5 g/L	27.7
Citrat-Puffer (pH 3.7)	-		0.0
Citrat-Puffer	Calciumchlorid	ca. 5 g/L	0.0 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Puffer-Zusammensetzung siehe Experimenteller Teil

<sup>2</sup> Messung homogen, Aktivität (nach 7 Tagen bei Raumtemperatur und Tageslicht) bezogen auf den höchsten Wert aller Substanzen zu Beginn der Meßreihe.

<sup>3</sup> Es ließ sich auch bei einer kürzeren Testdauer kein stabilisierender Effekt durch Calcium nachweisen.

Auch hier konnte durch zufällige pH-Wert-Abweichungen gezeigt werden, daß saure Medien die Stabilität von Peroxidase-Tracern stark beeinträchtigen. Ein Anteil von 10 % Lösungsmittel kann Peroxidase langsam denaturieren. Besonders schonend zeigten sich Tetraethylenglycol, Ethanol, Methanol, Acetonitril und DMSO. Dagegen müssen Glyme, Aceton und DMF als stärker destabilisierend eingestuft werden. Diese Ergebnisse sollten bei Tracersynthesen berücksichtigt werden, da besonders beim Kopplungsschritt erhebliche Lösungsmittelkonzentrationen auftreten können.

Tabelle 21: Stabilisierung von Peroxidase-Tracern (II).

Zusatz <sup>1</sup>	Konzentration [%]	Aktivität [%] <sup>2</sup>
Rinderserumalbumin (BSA)	10	56.5
Häm (Protoporphyrin-IX-eisen(II)chlorid)	0.001	23.8
Tween 20	1	10.7
Triton X-100	1	11.6
n-C12/C14-Alkylglucosid [453]	1	4.4
Thioglycolsäure <sup>3</sup>	1	0.0
Mercaptobernsteinsäure <sup>4</sup>	1	0.0
Ascorbinsäure <sup>5</sup>	1	0.0
Carboxymethylcellulose (CMC)	2	4.9
Poly(dimethylamino-hexamethylen)	2	10.2
Polyvinylalkohol	2	2.5
$\beta$ -Alanin	5	2.5
Sorbit	20	1.5
Glycerin	25	0.2
Tetraethylenglycol	10	3.0
Polyethylenglycol	2	4.5
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10	0.7
Dioxan	10	0.0
Ethanol	10	2.4
Methanol	10	1.9
Aceton	10	0.1
Acetonitril	10	1.0
Dimethylformamid (DMF)	10	0.5
Dimethoxyethan (Glyme)	10	0.0

<sup>1</sup> Enthalten in PBS (pH 7.6)

<sup>2</sup> Messung heterogen, Aktivität (nach 9 Tagen bei Raumtemperatur und Tageslicht) bezogen auf den höchsten Wert aller Substanzen zu Beginn der Meßreihe.

<sup>3</sup> pH 3.7

<sup>4</sup> pH 4.0

<sup>5</sup> pH 5.3

Bei einer weiteren Meßreihe wurde die Konservierungswirkung verschiedener Stoffe geprüft. Alle Ansätze zeigten im Untersuchungszeitraum von 16 Tagen keine sichtbaren mikrobiellen Veränderungen. Die beste Erhaltung der Enzymaktivität zeigten Thymol, Sorbinsäure, Ethylenglycolmonosalicylat und Natriumsalicylat (in dieser Reihenfolge). Thimerosal zeigte auch hier eine schlechte Verträglichkeit mit Peroxidase. Thymol scheint daher das günstigste Konservierungsmittel zu sein.

**Tabelle 22: Konservierung von Peroxidase-Tracern.**

Zusatz <sup>1</sup>	Konzentration [%]	Aktivität [%] <sup>2</sup>
Sorbinsäure (Kaliumsalz)	0.1	7.0
Natriumsalicylat	0.1	2.9
Benzoessäure	0.1	0.0
Kaliumformiat	0.1	2.1
Isonicotinsäurehydrazid	0.1	4.3
Thymol	0.05	13.6
Chloressigsäure	0.05	3.2
Ethylenglycol-monosalicylat	0.1	6.3
Iod/KI	0.00025 mol/L	2.2
Thimerosal (Merthiolat)	0.005	0.1

<sup>1</sup> Enthalten in PBS (pH 7.6) mit 10 mg/L Häm, 5 g/L BSA und 0.1 % Tween 20

<sup>2</sup> Messung heterogen, Aktivität (nach 16 Tagen bei Raumtemperatur und Tageslicht) bezogen auf den höchsten Wert aller Substanzen zu Beginn der Meßreihe.

## 7.5 Stabilisierung der Substratlösung

Tetramethylbenzidin (TMB) ist zur Zeit das am empfindlichsten nachweisbare chromogene Substrat der Meerrettich-Peroxidase. Die günstigeren toxikologischen Daten von TMB sind ein weiterer Grund, andere in Frage kommende Substrate wie o-Phenylendiamin, ABTS o.a. nicht zu verwenden. Doch einen gravierenden Nachteil hat TMB: Die komplette Substratlösung (Puffer, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und TMB) ist nicht haltbar. Schon nach 10-20 Minuten tritt eine meßbare Blaufärbung auf. Dies ist zwar für die Richtigkeit eines Immunoassays nicht entscheidend, der dynamische Meßbereich wird jedoch eingeengt.

Die genaue Ursache dieser spontanen Reaktion ist nicht eindeutig geklärt. Es werden photochemische Prozesse oder eine katalytische Aktivität von Verunreinigungen in Betracht gezogen.

Um die Herstellung der Substratlösung zu vereinfachen, wurden hier Vorversuche unternommen, geeignete Stabilisatoren zu finden. In Abb. 120 ist der Verlauf der Blaufärbung aufgetragen. Man erkennt, daß das Substrat keineswegs quantitativ umgesetzt wird. Nur ein kleiner Anteil des Substrats (Größenordnung 2 %) wird spontan zum Farbstoff. Dies könnte auf eine im TMB schon vorhandene Verunreinigung zurückzuführen sein. Eine Nachreinigung könnte hier Abhilfe schaffen. Es wurden jedoch Reagenzien gefunden, die die Verfärbung stark verlangsamten bzw. unterdrücken. So ist sowohl EDTA, als auch  $\beta$ -Cyclodextrin hierzu geeignet. Möglicherweise sind hier zwei völlig unabhängige Mechanismen wirksam. Für EDTA könnte man sich eine Komplexierung von katalytischen Schwermetallionen vorstellen,  $\beta$ -Cyclodextrin dürfte eher eine Einschlußverbindung des TMBs oder eines TMB-Derivats bilden. Strukturell besonders auffallend ist das deutlich unterschiedliche Verhalten von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cyclodextrin. Hier könnten sich tatsächlich die abweichenden molekularen Dimensionen des Hohlraums in den Cyclodextrinen manifestieren (siehe Tabelle 23).

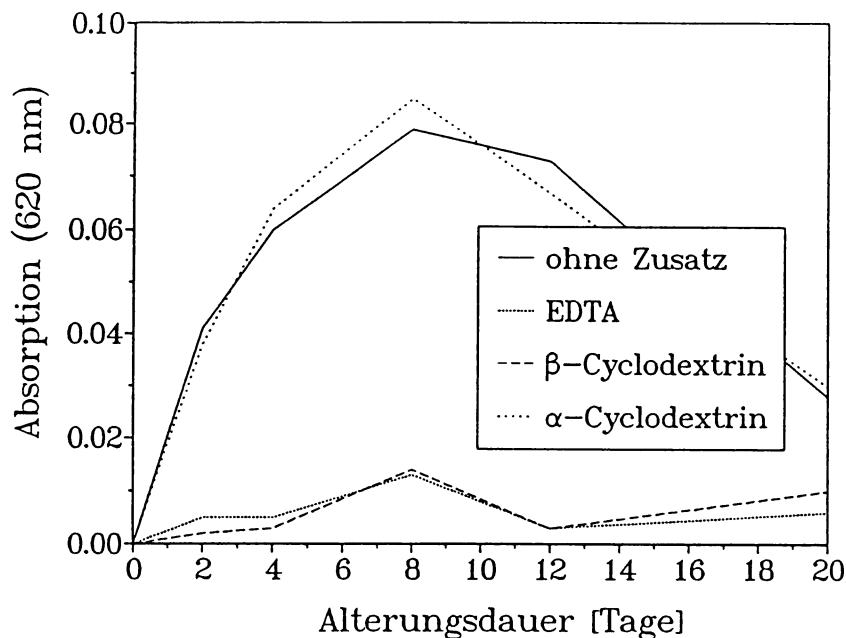
**Tabelle 23: Vergleich der Dimensionen von Tetramethylbenzidin und Cyclodextrinen.**

Daten aus [454]	$\alpha$ -Cyclodextrin	$\beta$ -Cyclodextrin	Tetramethylbenzidin
Hohlraum-Durchmesser [Å]	4.7-5.3	6.0-6.5	6,2 <sup>1</sup>
Höhe des Torus [Å]	7.9	7.9	10.6 <sup>2</sup>
Volumen des Hohlraums [Å <sup>3</sup> ]	174	262	-

<sup>1</sup> Breite des Moleküls, Abschätzung aus energieminimierter ALCHEMY-Struktur [429]

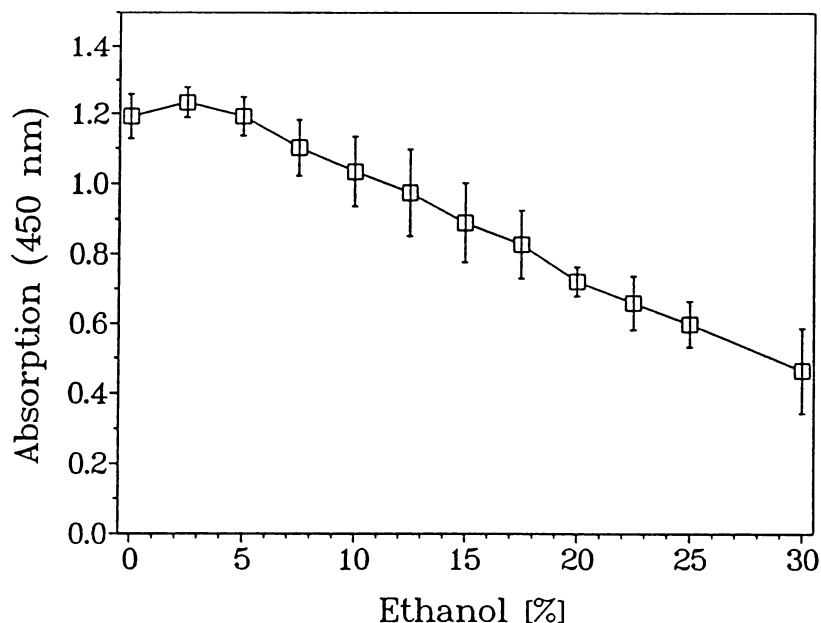
<sup>2</sup> Länge des Moleküls, Abschätzung aus energieminimierter ALCHEMY-Struktur

Besonders interessant war die Verfolgung der noch zur Farbstoffbildung befähigten Gesamtmenge im Substrat. Es wurde allgemein angenommen, daß Wasserstoffperoxid eine eher instabile Verbindung darstellt, die in kurzer Zeit entweder katalytisch zerfällt oder bei der Oxidation von reduzierenden Stoffen verbraucht wird. Trotzdem ist in 20 Tagen keine signifikante Abnahme des Farbstoffbildungspotentials zu bemerken, und dies unabhängig von den zugesetzten Stabilisatoren. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß EDTA und  $\beta$ -Cyclodextrin gute Additive für die Stabilisierung von TMB-Substratlösungen darstellen. Als günstiger Nebeneffekt dürfte sich die Löslichkeit von TMB in wässrigen Lösungen durch den Zusatz von  $\beta$ -Cyclodextrin steigern lassen, was gelegentlich auftretende, lästige Niederschläge unterbinden sollte.



**Abb. 120: Stabilisierung von TMB-Substratlösungen durch Zusätze.** Citratpuffer pH 3.8, 0.004 %  $H_2O_2$ , 200  $\mu$ L TMB-Stammlösung. Zusätze ca. 10 g/L. Aufbewahrung: RT, in Klarglas bei normaler Beleuchtung.

Eine andere Möglichkeit, das Ausfallen von TMB zu vermeiden, ist der Zusatz von Lösungsmitteln. Zudem ist es denkbar, auf diese Weise gleichzeitig eine Konservierung des durch mikrobiellen Befall sehr gefährdeten Citratpuffers zu erreichen. Im folgenden Experiment wurde immobilisierter Peroxidasetracer mit Substratlösungen ansteigender Lösungsmittelgehalte versetzt. Aufgrund der geringen Toxizität und den Hinweisen in einer Arbeit von RUPPERT et al. [359], daß insbesondere Alkohole in mäßigen Konzentrationen keine Hemmwirkung im ELISA zeigen, wurde Ethanol als Lösungsmittelzusatz gewählt. Zudem wurde teilweise eine Erhöhung der Absorption durch Anteile von Solventien gefunden, was vermutlich auf die Verringerung der Viskosität (bessere Durchmischung, schnellere Diffusion) zurückzuführen ist. Es ist jedoch keine signifikante Erhöhung der Absorption in Abb. 121 zu erkennen. Zumindest können 5 % Ethanol ohne jeden Einfluß und 10 % ohne entscheidende Einbußen hinzugefügt werden. Die Absorption ist bei 25 % Ethanol erst auf ca. 50 % des Ausgangswerts abgesunken. Insofern steht ein breites Intervall zur Verfügung, um die Lösungseigenschaften sowie die Stabilität des Puffers zu verbessern.



**Abb. 121:** *Einfluß des Ethanolgehalts auf die Farbstoffentwicklung. Antikörper: anti-POD (Sigma), 1:10.000, 200 µL, 48 h, 4 °C, Tracer: i-Pr/Cl/C3 1:40.000, 200 µL, 7 h, Entwicklung: Citrat-Puffer/-Ethanol-Gemisch 20 ml, 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%), 100 µL TMB Stammlösung, 20 min, zu hohe Absorptionen, daher bei 405 nm gemessen.*

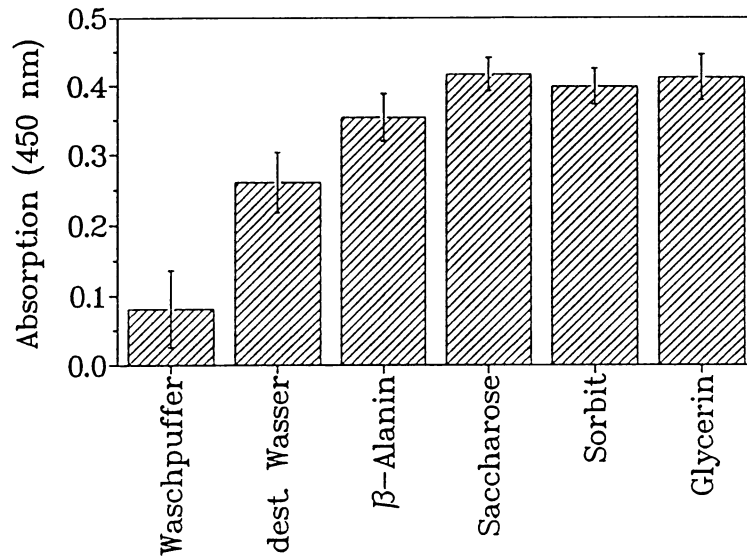
## 7.6 Stabilisierung des Antikörpers

Da bei der üblichen ELISA-Konfiguration der Antikörper nicht mit der Peroxidase in Kontakt kommt, kann eine Stabilisierung ohne weiteres mit Natriumazid erfolgen. Azid ist sehr wirksam, bewährt und im Gegensatz zu Thimerosal ist auch kein diffuser Quecksilbereintrag in die Umwelt vorhanden. Trotzdem sollte Natriumazid mit großer Vorsicht gehandhabt werden, da die toxikologischen Eigenschaften nicht günstig sind.

Die Denaturierung von Antikörpern zu unterbinden ist wesentlich schwieriger und kann bei jedem Antikörper nur individuell optimiert werden.

Besonders wichtig für den Anwender ist jedoch die Stabilisierung des Antikörpers im trockenen Zustand auf der Mikrotiterplatte. Einfaches Trocknen hat bedauerlicherweise erhebliche Aktivitätseinbußen zur Folge, die auch 100 % betragen können. Eine Strategie besteht darin, zwar die Luftfeuchtigkeit stark abzusenken, um mikrobiellen Befall sicher zu unterbinden, das völlige Austrocknen des Antikörpers jedoch zu verhindern. Dies kann durch das Nachbeschichten mit hydrophilen bzw. hygroskopischen Stoffen erreicht werden. Ein Vorversuch in dieser Richtung zeigte, daß Stoffe wie Saccharose, Sorbit oder Glycerin zumindest kurzfristig gleich wirksam sind (Abb. 122). Vielleicht würde ein Langzeitversuch

noch zu einer Differenzierung führen. Zusätzlich zu den untersuchten Stoffen werden auch Polymere wie Polyvinylalkohol zur Nachbeschichtung benutzt.



**Abb. 122:** Stabilisierung von Antikörpern auf getrockneten Mikrotiterplatten. Antikörper: anti-Peroxidase (Sigma) 1:10.000, 3 d, 4 °C, 200 µL, Stabilisatoren: 50 g/L, 4fach gewaschen, 300 µL Stabilisator, 5 min, ausgeschüttet, ausgeklopft, bei RT getrocknet, Test nach 48 h, 4fach gewaschen, POD-Lösung 1:10.000, 200 µL, 1h, 4fach gewaschen, Substrat 1:4 verd., Entwicklung 1 min.



### 7.7 Interne Standards für die Gaschromatographie

Daß neu synthetisierte Verbindungen manchmal für völlig andere Zwecke nützlich sein können, für die sie ursprünglich geplant waren, zeigt dieses Beispiel erneut. So konnten die für die Untersuchungen zur Spacer Recognition hergestellten Atrazin-Derivate auch nach neuen internen Standards für chromatographische Verfahren durchsucht werden. Hier ist es besonders wichtig, daß die Substanzen den untersuchten Analyten möglichst ähnlich ist, ohne jedoch Trennprobleme aufzuwerfen.

Zudem ist es vorteilhaft, für jeden Aufarbeitungsschritt einen eigenen internen Standard zu verwenden, um die Kontrolle über das Gesamtverfahren zu verbessern. Deshalb ist eine große Auswahl potentiell verwendbarer Substanzen hilfreich, besonders wenn diese entweder völlig neu sind oder wenigstens noch nie in größerem Umfang hergestellt worden sind und daher höchstwahrscheinlich in der Umwelt nicht vorkommen. Prinzipiell sind für diesen Zweck z.B. deuterierte Verbindungen gut geeignet. Bedauerlicherweise sind diese Derivate kommerziell und synthetisch schwer zugänglich, da die Edukte rar und teuer und die Produkte manchmal nicht stabil sind (Wasserstoffaustausch).

Im Bereich der klassischen Derivate bieten sich jedoch sehr gute, wenn nicht sogar bessere Alternativen an, die um Größenordnungen preisgünstiger sein können. So kann man z.B. Isomere von Alkyl-Derivaten herstellen. Auch die Synthese einer homologen Reihe ist hier denkbar. Diese Verbindungen sind ausreichend ähnlich und doch gaschromatographisch gut zu trennen. Um Kollisionen mit anderen Analyten zu vermeiden, ist in jedem Fall eine individuelle Auswahl anzuraten.

So wurden erstmals von SCHNEIDER [455] "n-Propylatrazin" (i-Pr/Cl/n-Pr) bei der gaschromatographischen Bestimmung von Triazin-Herbiziden und "Methylatrazin" (i-Pr/Cl/Me) für die Extraktion (Soxhlet, SPE, SFE) als interne Standards eingesetzt. Auch RUPPERT [179] hat n-Propylatrazin erfolgreich als internen Standard für die Gaschromatographie verwendet.



## V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Kinetik von Hapten-Immunoassays wurde durch Experimente sowie Computersimulationen detailliert untersucht. Der Schwerpunkt lag auf der Entwicklung einfacher und vielseitiger Verfahren, kinetische bzw. thermodynamische Konstanten mit Mikrotiterplatten zu messen. Besonders interessant dürfte eine neue Methode der Bestimmung der Gleichgewichtskonstante auf der Grundlage der Ermittlung des Testmittelpunkts sein, die ohne radioaktiv markierte Analyten auskommt. Auch für die Messung der Dissoziationskonstante des Antikörper-Hapten-Komplexes wurde eine neue Methode vorgestellt. Den Enzym-Tracer betreffend wurde gefunden, daß keine einfache Kinetik vorliegt. Die Hypothese, daß die adsorptive Bindung des Tracers an der Mikrotiterplatte eine wichtige Rolle für den Verlauf eines ELISAs spielt, konnte durch zahlreiche Experimente untermauert werden. Mit Hilfe von numerisch simulierten Immunoassays wurden Wege zur Entwicklung neuer Testkonfigurationen aufgezeigt. Zudem konnten mit Daten aus Computersimulationen einige unklare Effekte erklärt werden.

Mit zahlreichen neu synthetisierten Hapten-Derivaten konnten Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden, die einige "Regeln" im Immunoassaybereich in einem neuen Licht erscheinen lassen. So konnte gezeigt werden, daß im Gegensatz zu oft geäußerten Vermutungen, stark bindende Tracer keine negative Auswirkungen auf die Empfindlichkeit von ELISAs haben müssen. Im Gegenteil, hohe Traceraffinitäten haben einen günstigen Einfluß auf die Stabilität der Komplexe bei Waschvorgängen und führen zu höheren Absorptionen bzw. schnelleren Entwicklungsvorgängen.

In einem ähnlichen Kontext sind Untersuchungen zur Spacer-Erkennung ("Bridge Recognition") zu sehen. So wurde eine homologe Reihe von Spacerderivaten in ihren Kreuzreaktionen vermessen. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß hervorragende Antikörper eine extrem hohe Affinität zu Spacerderivaten haben können. Auch die weit verbreitete Ansicht, daß homologe Systeme zu Empfindlichkeitseinbußen führen würden, konnte in keinem Fall bestätigt werden. Die häufig publizierten Erfolgsmeldungen bei heterologen Systemen können häufig auf ein experimentelles Artefakt zurückgeführt werden, da die Immunoassays bei identischen und nicht bei optimalen Tracerkonzentrationen durchgeführt wurden. Die optimale Konzentration ist nicht bei jedem Tracer identisch, sondern von der Traceraffinität abhängig.

Es konnte demonstriert werden, daß sog. "Brückenantikörper" einen Sammelbegriff verschiedener Phänomene bilden. Es wird die Hypothese formuliert, daß es (mindestens) zwei unterschiedliche Arten "Brückenantikörper" gibt, erster und zweiter Art. Brückenantikörper 1. Art binden Spacerderivate mit höheren Affinitäten als den Analyten. Wie bei Untersuchungen zur "Bridge Recognition" gezeigt werden konnte, ist diese Eigenschaft positiv zu werten, da sie oft mit hoher Sensitivität korreliert ist. Dagegen haben "Brückenantikörper" 2. Art sehr unangenehme Folgen. Es werden Eichkurven mit niedriger Steigung und/oder

hoher "unspezifischer" Bindung erhalten. In der vorliegenden Arbeit können erstmals starke Argumente präsentiert werden, daß diese Brückenantikörper 2. Art nichts mit Spacern oder Brücken zu tun haben. Sie wurden in den untersuchten Fällen von verunreinigten Haptenen (Tracer) oder labelbindenden Antikörpern verursacht. Alle Merkmale der "Brückenantikörper" (2. Art) konnten durch intensive Reinigung des Haptens bzw. Reinigung des Serums vollständig beseitigt werden. Insofern ist hier der Ausdruck "Brückenantikörper" nicht gerechtfertigt.

Zum Thema Sensitivität konnte mit unterschiedlichsten Ansätzen gezeigt werden, daß im ELISA-Normalfall die Affinität des Antikörpers zum Analyten die ultimative Begrenzung darstellt. Dies bedeutet, daß auch mit sehr subtilen Methoden (z.B. zur Signalverstärkung) keine Verbesserung der Nachweisgrenze gelingt. Die einzig effektive Strategie ist die Herstellung neuer Antikörper. Da dieser Weg über das sehr komplexe und nur fragmentarisch verstandene Immunsystem läuft, wurden hier Regeln formuliert, die sich aus der Erfahrung für diese Arbeit durchgeführter und vieler publizierter Immunoassays ableiten. Diese Regeln sind sicherlich nicht als unumstößliche Naturgesetze zu verstehen, sondern eher als Anhaltspunkt, die nach dem jetzigen Stand der Technik bessere Variante auszuwählen. Es wurde gezeigt, daß Immunoassays mit völlig unterschiedlichen Prioritäten optimiert werden können. So können ELISAs erheblich beschleunigt werden, wenn kinetische Aspekte berücksichtigt werden. Im Gegensatz zu mehrfach veröffentlichten Theorien, daß verkürzte Inkubationszeiten zu erheblichen Einbußen der Selektivität führen würden, konnte experimentell belegt werden, daß dies zumindest allgemein nicht richtig ist. Es konnten keine signifikanten Veränderungen der Selektivität beobachtet werden. Diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse konnten mit Hilfe von Computersimulationen in ein Modell integriert werden.

Es zeigte sich, daß die Selektivität eines Immunoassays nur in sehr engen Grenzen verändert werden kann. Hier gilt sinngemäß das im vorherigen Abschnitt über Sensitivität gesagte. Nur ein verbesserter Antikörper kann eine grundlegende Verbesserung der Selektivität bringen, was die Wichtigkeit einer sorgfältigen Planung und Synthese von zur Immunisierung verwendeten Haptenderivaten unterstreicht. Der Schwerpunkt der Investitionen sollte auf diesem primären Sektor liegen, da Mängel des Antikörpers später nur in sehr bescheidenem Ausmaß ausgeglichen werden können. Es gibt in Einzelfällen Möglichkeiten die Selektivität gezielt zu verändern. Es ist z.B. gelungen, durch Protonierung von kreuzreagierenden Substanzen (mit höherem  $pK_a$ -Wert) diese Störung fast quantitativ auszuschalten. Der Grad der Selektivitätsänderung konnte mit erstaunlicher Genauigkeit aus dem Protonierungsgrad der Analyten berechnet und damit prognostiziert werden. Aus diesen Ergebnissen kann man auch die bisher völlig unterschätzte Bedeutung der Protonierung von Analyten, Immunogenen und Tracern ableiten. So kann z.B. nicht erwartet werden, daß eine Immunisierung mit Amid-Derivaten eine hohe Empfindlichkeit für den Carbonsäure-Analyten (negativ geladen) ergibt.

Mit Computersimulationen konnte gezeigt werden, daß es neue Möglichkeiten gibt, ELISAs zu konstruieren, die einen Summenparameter angeben. Dies kann wahrscheinlich realisiert

werden, wenn man ein assoziationslimitiertes Regime erreicht. In diesem Fall werden die Affinitätskonstanten weitgehend irrelevant.

Bei einem Versuch, monoklonale Triazin-Antikörper herzustellen, wurden 4 Klone gefunden, die in Sensitivität und Selektivität mit den besten bisher bekannten monoklonalen Triazinantikörpern vergleichbar sind. Dies wurde mit einem modifizierten Screening-Verfahren erreicht, das auf der Grundlage einer Tracer-Mischung aus zehn Komponenten aufbaut. Dieses Screeningverfahren hat sich als sehr selektiv gezeigt, alle positiven Antikörper waren prinzipiell analytisch interessant. Zudem wurde ein Test für die Alltagstauglichkeit der Antikörper eingebaut, der aus der Messung der Kreuzreaktion zu Huminsäuren besteht. Dies soll vermeiden, daß für analytikuntaugliche Antikörper (matrixempfindlich) aufwendige Charakterisierungsprozeduren durchgeführt werden.

Im Laufe dieser Arbeiten wurden zahlreiche Triazinderivate für Struktur-Untersuchungen synthetisiert, die u.a. zur Herstellung von Enzymtracern verwendet wurden. Auf diese Weise konnten Immunoassays, die bisher zur Kontrolle des strengen Trinkwassergrenzwerts von  $0.1 \mu\text{g/L}$  nicht geeignet waren, so optimiert werden, daß sie heute für Routineprojekte eingesetzt werden bzw. den Grenzwert ohne Probleme erfassen können.

Es konnte ein neuer hydrophiler Spacer synthetisiert werden, der u.a. bei schwerlöslichen Haptenen oder zur verbesserten immunologischen Präsentation angewendet werden kann. Der weitgehende Zwang zur Verwendung von Alkylspacern ist mit diesen gut zugänglichen Derivaten aufgehoben, bei denen auch Anwendungen außerhalb der Immunologie denkbar sind.

Zudem konnten zahllose Verbesserungen im Zusammenhang mit der Durchführbarkeit von ELISAs erreicht werden, z.B. Stabilisierung und Konservierung von Puffern, Antikörpern, Substratlösungen und Tracern. Dies macht sich weniger in den analytischen Kenndaten eines Tests bemerkbar, als im Aufwand, der für einen ELISA notwendig ist. Diese Überlegungen haben besonders hohe Bedeutung, wenn ein Immunoassay aus dem reinen Forschungslabor in die Applikation bzw. die Routineanalytik übernommen werden soll oder eine Kommerzialisierung geplant ist.

## VI. AUSBLICK

Es muß betont werden, daß die Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Immunoassays den Anwendungen weit hinterher hinkt. Dies erkennt man z.B. daran, daß in vielen Bereichen noch Experimentalvorschriften aktuell sind, die Jahrzehnte alt sind. Die Entwicklung von ELISAs ist auch heute noch in gewissem Maße eine "Kunst" geblieben, was die theoretischen Defizite klar aufzeigt. Die eher auf kurzfristige Erfolge ausgerichtete Forschungsförderung hat sicherlich ihren Beitrag zu dieser unerfreulichen Entwicklung geleistet. So werden lieber zahllose neue Immunoassays mit Standardverfahren hergestellt, als daß grundlegende Probleme angegangen würden.

Es lassen sich momentan sechs interessante Bereiche der Immunoassay-Entwicklung erkennen: Klassische ELISAs, die zu hochentwickelten und voll- oder teilautomatisierten Laborsystemen ausgebaut werden, stehen in direkter Konkurrenz zu etablierten instrumentellen Verfahren. Doch darf dieser Gegensatz nicht zu scharf gesehen werden, was man schon daran sieht, daß es erste Versuche zur Kopplung von ELISAs mit chromatographischen Verfahren (Immunodetektor) gibt. Auch die umgekehrte Variante wird angewendet: So können Immunosäulen zu einem sehr schnellen und effektiven "Clean-up" von Proben herangezogen werden, die letztlich aber instrumentell analytisch untersucht werden. Eine weitere Sparte bildet die Entwicklung von Schnelltests (Teststreifen u.ä.), die auch der analytische Laie anwenden soll. Der Schwangerschaftstest aus der Apotheke ist hier sicherlich das bekannteste Beispiel und zeigt eindringlich, daß extreme Vereinfachungen der Handhabung durchaus möglich sind, wenn hier auch sehr subtil konstruierte Systeme notwendig sind. Ein bisher weniger erfolgreiches Gebiet bildet der Bau von Immunosensoren. Die meisten Systeme sind wenig langzeitstabil, unempfindlich, langsam, nur begrenzt regenerierbar (wenn überhaupt) und kompliziert im Aufbau und in der Anwendung. Hier müssen noch erhebliche Fortschritte gemacht werden, bis der Traum der Immunosonde in Erfüllung gehen kann. Gleichfalls noch von einem Durchbruch entfernt ist die Idee, Immunoassays zu Multianalyt-Verfahren zu erweitern. Es fehlen z.B. ausreichend zahlreiche Antikörper, die in hoher Qualität zur Verfügung stehen müssen. Hier sind Basistechnologien wie die gentechnologische Herstellung von Antikörpern gefragt. Sollte sich auf diese Weise die Gewinnung von Antikörpern stark vereinfachen, können für viele heute noch kaum vorstellbare Anwendungsbereiche Immunoassays entwickelt werden.

## VII. EXPERIMENTELLER TEIL

## 1 Verwendete Geräte

8-Kanal-Spektrophotometer (Reader) für Mikrotiterplatten (SLT, Overath, TR 400)  
8-Kanal-Waschgerät (Washer) für Mikrotiterplatten (SLT, Overath, EAW II plus)  
Orbital-Schüttler für Mikrotiterplatten (SLT, Overath, EAS 2/4)  
Vibrationsschüttler für Mikrotiterplatten (Institut Virion, Würzburg)  
8-Kanal-Pipette 50-200  $\mu\text{L}$  (Dynatech, Denkendorf, S8/200)  
12-Kanal-Pipette 50-200  $\mu\text{L}$  (Dynatech, Denkendorf, S12/200)  
Mikrotiterplatten, Flachboden, hohe Bindungskapazität, (Greiner, Nürtingen, 655061)  
UV-Reaktor zur Wasserreinigung, DOC < 1 ppb (Gräntzel, Karlsruhe)  
Multipette (Eppendorf, Hamburg, 4780)  
Varipetten 10..100  $\mu\text{l}$ , 100..1000  $\mu\text{l}$  (Eppendorf, Hamburg, 4710)  
UV-VIS-Spektrophotometer DU 650 (Beckman Instruments, Fullerton, USA)  
Gelchromatographie-Säulen PD-10, Sephadex G-25M (Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden)  
Dialysierschlauch Visking, Typ 27/32 (Roth, Karlsruhe, 1784.1)  
Fractogel TSK HW-40 (F) (14982, Merck, Darmstadt)  
Parafilm M, 4 x 250 ft., (American National Can, Greenwich)  
Schmelzpunktbestimmungsapparat nach Dr. Linström (Wagner & Munz, München)  
Elektronisches Thermometer, THERM 2280-3 (Ahlborn, Holzkirchen)  
Kernresonanzspektrometer, JNM GX 270, FT NMR Spectrometer (JEOL)  
Dünnschicht-Fertigfolien, POLYGRAM SIL G/UV<sub>254</sub> (Macherey-Nagel, Düren, 805021)  
Nano-Platten SIL-20 UV<sub>254</sub> zur DC, 5x5 cm (Macherey-Nagel, Düren)  
Zentrifuge Biofuge 17RS mit Winkelrotor 1379 (Heraeus Sepatech, Osterode)  
GC-MSD: HP 5890 Serie II mit massenselektivem Detektor HP 5971  
(Hewlett Packard, Palo Alto, CA)  
GC-NPD: HP 5890A mit Stickstoff/Phosphor-selektivem Detektor, NPD  
(Hewlett Packard, Palo Alto, CA)

## 2 Verwendete Chemikalien

Aceton, rein (24201, Riedel-de Haën)  
Acetonitril, for Chromatography (8257, Baker)  
 $\beta$ -Alanin, 3-Aminopropansäure, puriss. p.a. (05160, Fluka)  
n-C12/C14-Alkylglucosid, techn. (Henkel)  
Ameisensäure, puriss. p.a., 98% (06440, Fluka)  
Ametryn, 98% (35918, Charge 93140, Riedel-de Haën)  
6-Aminocapronsäure, 6-Aminohexansäure (07260, Fluka)  
11-Aminoundecansäure (801228, Merck-Schuchard)  
Ammoniaklösung, ca. 25%, rein, (05003, Riedel-de Haën)  
Ammoniumsulfat, puriss. p.a. (09980, Fluka)

Ascorbinsäure, Microselect >99.5% (95209, Fluka)  
Atraton, 96.5% (E103200, Charge 70429, Ehrenstorfer)  
Atrazin, 98.4% (E103300, Charge 80816, Ehrenstorfer)  
Benzoesäure, puriss. p.a. >99.5% (12349, Fluka)  
Butylamin, puriss. (19480, Fluka)  
t-Butylamin, puriss. p.a. >99.5% (19520, Fluka)  
t-Butylmethylether, MTBE, purum (20252, Fluka)  
Calciumchlorid Hexahydrat, purum p.a. (21110, Fluka)  
Carboxymethylcellulose, Natriumsalz, >99.5% (21901, Fluka)  
Chloressigsäure, puriss. p.a. (24510, Fluka)  
Citronensäure, p.a. (27847, Fluka)  
Cyanurchlorid, purum (28620, Fluka)  
 $\alpha$ -Cyclodextrin Hydrat (85,609-6, Aldrich)  
 $\beta$ -Cyclodextrin Hydrat (85,608-8, Aldrich)  
Cyclopentylamin, purum (29830, Fluka)  
Cyclopropylamin, purum (29940, Fluka)  
Desethylatrazin, 97.1% (E103310, Charge 71020, Ehrenstorfer)  
Desisopropylatrazin, 98.5% (E103320, Charge 70211, Ehrenstorfer)  
1,8-Diaminooctan, z. Synth. > 98% (806916, Merck-Schuchard)  
1,3-Diaminopropan, puriss. >99% (33250, Fluka)  
Dichlorprop, Pestanal (35717, Riedel-de Haën)  
Dicyclohexylcarbodiimid, 99 % (60310, Riedel-de Haën)  
Diglycolsäureanhydrid, techn. (37083, Fluka)  
Dikaliumhydrogenphosphat, Microselect (60354, Fluka)  
Dimethoxyethan, Glyme, purum (38570, Fluka)  
N-(Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid, EDC, purum (03450, Fluka)  
N,N-Dimethylformamid, DMF, >99.5% (40250, Fluka)  
Dimethylsulfoxid, DMSO, puriss. p.a. (41640, Fluka)  
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, Microselect (71644, Fluka)  
2,4-Dinitrophenylessigsäure, pract. (42200, Fluka)  
Dioxan, p.a. (42512, Fluka)  
Di-(N-succinimidyl)-carbonat, DSC, purum (43720, Fluka)  
Essigsäure, puriss. p.a., >99.5% (45730, Fluka)  
Essigsäureethylester, p.a. >99.5% (9623, Merck)  
Ethanol, absolut, zur Analyse (32205, Riedel-de Haën)  
Ethylamin, 70% in Wasser (820024, Merck-Schuchard)  
Ethylenglycolmonosalicylat, purum >98% (03830, Fluka)  
2,2'-(Ethylendioxy)-diethylamin, purum (03739, Fluka)  
Ethylenglycol, reinst >99% (949, Merck)  
Ethylquecksilberthiosalicylsäure, Natriumsalz, Thimerosal, Merthiolat (11340, Serva)  
Gelatine, gemahlen, weiß (Rump & Flerlage)  
Glutarsäuredihydrazid, >96% (G 420-9, Aldrich)  
Glutathion, reduziert (4090, Merck)



Glycerin, zur Synthese (818709, Merck-Schuchard)  
Glycin, >99% (50050, Fluka)  
Häm, Hämin >99% (51280, Fluka)  
Hämocyanin, aus *Helix pomatia* (A 24446, Serva)  
Hexylamin, purum (53131, Fluka)  
Huminsäure Natriumsalz, depur (7824, Roth)  
N-Hydroxysuccinimid, purum (56480, Fluka)  
Iod-Lösung, 0.05 mol/L (57664, Fluka)  
Isonicotinsäurehydrazid, purum (58980, Fluka)  
Isopropylamin, puriss. (59320, Fluka)  
Kaliumcarbonat, puriss. p.a. (60109, Fluka)  
Kaliumdihydrogencitrat, p.a. (60215, Fluka)  
Kaliumdihydrogenphosphat, Microselect (60219, Fluka)  
Kaliumformiat, Microselect, >99.5% (60246, Fluka)  
Kaliumsorbit (S-1751, Sigma)  
KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin (H2133, Sigma)  
L-Lysinmonohydrochlorid, >99% (62930, Fluka)  
Mercaptobernsteinsäure, zur Synthese (820763, Merck)  
3-Mercaptopropionsäure, puriss. (63770, Fluka)  
Methanol, HPLC (M/4056/17, Fisons)  
Methylamin, 35% in Wasser (822091, Merck-Schuchard)  
2-Methylmercapto-4,6-dichlor-1,3,5-Triazin, MDT (Geschenk der Degussa AG, Wesseling)  
Molekularsieb, 3 Å (5704, Merck)  
Natriumazid, p.a. (6688, Merck)  
Natriumcarbonat, Microselect (71345, Fluka)  
Natriumchlorid, Microselect (71378, Fluka)  
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat, Microselect (71502, Fluka)  
Natriumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat, Biochemica >98% (71729, Fluka)  
Natriumhydrogencarbonat, Microselect (71627, Fluka)  
Natriumperiodat, Microselect (71859, Fluka)  
Natriumtetraborat Decahydrat, Borax, Microselect (71999, Fluka)  
Natriumsalicylat, puriss. p.a. >99.5% (71945, Fluka)  
Natriumsulfat wasserfrei, puriss. p.a. (71960, Fluka)  
Ninhydrin, p.a. (6762, Merck)  
Pentylamin, purum (77060, Fluka)  
Peroxidase, aus Meerrettich, für EIA, ca. 1000 U/mg, ABTS (814407, Boehringer)  
Phosphorylchlorid, zur Synthese (822339, Merck-Schuchard)  
Poly(dimethylamino-hexamethylen), Ionen C 6 (Bayrol)  
Polyethylenglycol 20000 (9732, Merck)  
Polymerträger VA-Epoxy (39354, Riedel-de Haën)  
Polyvinylalkohol 49000 (81383, Fluka)  
Propazin, 99.5% (E164400, Charge 91211, Ehrenstorfer)  
n-Propylamin, zur Synthese (807477, Merck-Schuchard)

Pyren, 99+ % (18,5551-5, Aldrich)  
Pyrenbuttersäure, >97% (82655, Fluka)  
Pyridin, puriss. p.a. >99.8% (82702, Fluka)  
Rinderserumalbumin, BSA (11930, Serva)  
Saccharose, Raffinade (Südzucker)  
Salzsäure >37% p.a. (30721, Riedel-de Haën)  
Schwefelsäure 95-97 %, puriss. p.a. (84720, Fluka)  
Simazin >99% (35780, Charge 5100, Riedel-de Haën)  
Sorbinsäure, Kaliumsalz (S-1751, Sigma)  
D(-)-Sorbit, reinst (7758, Merck)  
Terbutylazin, 99.9% (173000, Charge 90426, Ehrenstorfer)  
Terbutryn, 98% (35869, Charge 91070 Riedel-de Haën)  
Tetraethylenglycol, pract. >97% (86662, Fluka)  
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, research grade (35926, Serva)  
Thioglycolsäure, zur Analyse (700, Merck)  
Thymol, >99% (89330, Fluka)  
Titriplex III, EDTA, p.a. (8418, Merck)  
Toluol, p.a. >99.5% (8325, Merck)  
Triethylamin, puriss. p.a. (90340, Fluka)  
Triton X-100 (93420, Fluka)  
Triethylamin, puriss. p.a., >99.5% (90340, Fluka)  
Triphenylchlormethan, Tritelchlorid, purum (93000, Fluka)  
Tween 20 (93773, Fluka)  
Wasserstoffperoxid, p.a. >30% (95300, Fluka)

### **Firmenverzeichnis (Chemikalien)**

Aldrich Chemie, 7924 Steinheim  
Baker, Deventer (Niederlande)  
Bayrol, 8033 Martinsried  
Boehringer Mannheim, 6800 Mannheim 31  
Degussa, 6450 Hanau 1  
Dr. Ehrenstorfer, 8900 Augsburg  
Fluka Feinchemikalien, 7910 Neu-Ulm  
Henkel, 4000 Düsseldorf  
E. Merck, 6100 Darmstadt  
Riedel-de Haën, 3016 Seelze  
Carl Roth, 7500 Karlsruhe  
Dr. T. Schuchard, 8011 Hohenbrunn  
Serva Feinbiochemica, 6900 Heidelberg  
Sigma Chemie, 8024 Deisenhofen

## 3 Verzeichnis der Antikörper und Tracer

Bezeichnung	(Typ, Tier, Immunogen/Hapten)	Hersteller (et al.)
AK 13	(pAK, Kaninchen, Ametrynsulfoxid)	HOCK [191]
AK 15	(pAK, Kaninchen, Ametrynsulfoxid)	HOCK [191]
AK 19	(pAK, Kaninchen, Ametrynsulfoxid)	HOCK [191]
S84	(pAK, Schaf, i-Pr/Cl/C6)	WÜST [196]
CWoNr	(pAK, Kaninchen, i-Pr/Cl/C6)	WITTMANN [456]
C193	(pAK, Kaninchen, i-Pr/Cl/C6)	WITTMANN [197]
C10	(pAK, Kaninchen, H/Cl/C6)	WITTMANN [195]
K1F4	(mAK, Maus, Ametrynsulfoxid)	GIERSCH [201]
K1A11	(mAK, Maus, Ametrynsulfoxid)	GIERSCH [201]
P6A7	(mAK, Maus, i-Pr/Cl/Cl)	GIERSCH [47]
K4E7	(mAK, Maus, Et/Cl/C6)	GIERSCH [457]
Ciba 21-1	(mAK, Maus, i-Pr/Cl/C5)	SCHLAEPPi [187]
Ciba 85-3	(mAK, Maus, i-Pr/OH/C5)	SCHLAEPPi [187]
Ciba 77-20	(mAK, Maus, i-Pr/OH/C5)	SCHLAEPPi [187]
NMI 118	(mAK, Maus, "MIX10")	MANGLER [458]
NMI 54	(mAK, Maus, "MIX10")	MANGLER [458]
NMI 21	(mAK, Maus, "MIX10")	MANGLER [458]
NMI 71	(mAK, Maus, "MIX10")	MANGLER [458]
V1	(mAK, Maus, i-Pr/Et/C6)	VERSCHOOR [203]
16.89	(pAK, Kaninchen, Pyrenbuttersäure)	KNOPP [304]
No. M 5899	(pAK, Ziege, Maus-IgG)	SIGMA Chemie GmbH
No. A-4416	(pAK, Ziege, Maus-IgG, POD-Konjugat)	SIGMA Chemie GmbH
No. P-5774	(pAK, Ziege, Peroxidase)	SIGMA Chemie GmbH

---

<b>Struktur (POD-Tracer)</b>	<b>interne Bezeichnung</b>
i-Pr/Cl/C6	W-T014A, W-POD01A
t-Bu/Et/3MPS	TMP
i-Pr/Et/3MPS	AMP
i-Pr/SMe/C6	AC
i-Pr/Cl/C6-C2	GS
i-Pr/Cl/C6-C6	DS
i-Pr/Cl/C11	C11
i-Pr/OH/C6	W-T013A
i-Pr/Cl/EDA-DGS	W-THY0A
t-Bu/Et/C6	W-T100A
t-Bu/Et/C6 (mono)	W-MONO0A
i-Pr/Et/C6	W-TRAC63
H/Cl/C6	W-E046A, W-DAT0A
H/Cl/C11	W-DEC11A
i-Pr/OH/C6	W-T013A
i-Pr/Cl/C3	W-T005C
c-Pr/Cl/C6	W-TRAC61, W-TRAC69
c-Pentyl/Cl/C6	W-TRAC68
t-Bu/Cl/C6	W-TRAC62
Et/Cl/C6	W-TRAC71
Pyrenbuttersäure	W-E070, E0740A

## 4 Puffer und Stammlösungen

## Coating-Puffer (pH 9,6):

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	15 mmol	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub>	25 mmol	2,93 g
NaN <sub>3</sub>	3 mmol	0,20 g
Wasser (UV-behandelt)*		ad 1000 ml

## Phosphat-Puffer (PBS, pH 7,6):

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 mmol	1,56 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	70 mmol	12,46 g
NaCl	145 mmol	8,50 g
Wasser (UV-behandelt)*		ad 1000 ml

## Waschpuffer-Konzentrat 1:60 (PBS-Tween, ca. pH 7.6):

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	43.3 mmol	5,89 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	375 mmol	65,32 g
NaCl	873 mmol	51,0 g
Sorbinsäure, Kaliumsalz		0,2 g
Tween 20		30,0 ml
Wasser (UV-behandelt)*		ad 1000 ml

## Substratlösung (pH ca. 3,8):

KH <sub>2</sub> -Citrat	200 mmol	46,04 g
Sorbinsäure, Kaliumsalz		0,1 g
Wasser (UV-behandelt)*		ad 1000 ml

## TMB-Stammlösung:

Tetramethylbenzidin		0,375 g
Dimethylsulfoxid	5,0 ml (Vorlösen)	
Methanol	25,0 ml (Auffüllen)	

## Wasserstoffperoxidlösung:

Wasserstoffperoxid 30%		3,3 ml
Wasser (UV-behandelt)*		ad 100 ml

\*Wasser für die HPLC (o.ä.) ist gleichermaßen geeignet.

## 5 Standard-Testvorschriften

### 5.1 ELISA

**Coaten:** Eine Mikrotiterplatte (MTP) mit 96 Kavitäten wird mit je 200  $\mu\text{L}$  Antikörperlösung (1:20.000 in Coatingpuffer) gefüllt. Dann wird die Platte einige Minuten auf den Orbital-schüttler gestellt, um eine gleichmäßige Benetzung der Kavitäten zu gewährleisten. Die Platte wird z.B. mit Parafilm gegen Verdunstung und Verschmutzung geschützt. Das Coating kann entweder 3 bis 12 Stunden bei Raumtemperatur oder 12 bis 48 h bei ca. 4 °C durchgeführt werden. Schritte, die von der Raumtemperatur abweichen, sind besonders häufig die Ursache für einen "Randeffekt" und sollten daher gemieden werden. Auch benachbarte Trocken- oder Brutschränke, Sonnenbestrahlung, Luftzug etc. können zu ungleichmäßigen Temperaturen in der MTP führen. Nach Ablauf der Coatingdauer wird die Platte in einem "Washer" von ungebundenen Reagenzien befreit.

Als Waschflüssigkeit hat sich ein verdünnter PBS-Puffer mit Tween-Zusatz bewährt. Noch anhaftende Flüssigkeitsreste müssen durch Ausklopfen auf nichtfusselnden Tüchern entfernt werden. Es muß darauf hingewiesen werden, daß ungleichmäßiges Austrocknen der Platte völlig unreproduzierbare Ergebnisse verursacht. Daher sollte das Pipettieren zügig, aber ohne Hast erfolgen.

Für monoklonale Antikörper, die nicht ausreichend an der Platte adsorbiert werden (zu hoher Fremdproteingehalt bei Zellkulturüberständen), muß die Platte mit Anti-Antikörper-Seren (z.B. Anti-(Maus-IgG)) vorgecoatet werden (Coating-Puffer). Nach dem Waschen erfolgt das Nachcoaten mit dem analytbindenden Antikörper (PBS). Dann folgt wiederum ein Waschschritt.

**Vorinkubation:** Jeweils 200  $\mu\text{L}$  der Probe bzw. der Eichlösung werden in die Kavitäten pipettiert. Die Proben müssen unbedingt auf Raumtemperatur gebracht werden. Trübungen haben völlig unvorhersehbare Effekte zur Folge und müssen durch Filtration oder besser Zentrifugation beseitigt werden. Wasserproben, die einen hohen Gehalt an Calcium-Ionen enthalten, führen mit Phosphatpuffer zu Niederschlägen. In diesem Fall ist es ratsam (vorbeugend) ausreichende Konzentrationen EDTA zuzusetzen [459]. Die Reihenfolge ist beliebig, auch die Aufteilung der Platte kann nach Zweckmäßigkeit erfolgen. Es hat sich bewährt, die MTP mit den wichtigsten Daten seitlich zu beschriften und mit Hilfslinien auf den Stegen zu unterteilen, um Verwechslungen und Fehlpipettierungen zu minimieren. Wenn die letzte Kavität gefüllt ist, beginnt die Vorinkubationszeit, die in der Regel dazu dient, ein "Vorgleichgewicht" einzustellen und damit alle Unterschiede der Pipettierreihenfolge auszugleichen. Auch hier ist die Verwendung eines Schüttlers vorteilhaft. Bei kurzen Vorinkubationen ist eine Abdeckung nicht erforderlich.

Inkubation: Sodann wird die Tracerlösung vorbereitet, indem PBS-Puffer mit z.B. 0.1 % BSA versetzt wird der Tracer darin 1:50.000 verdünnt wird. Mit der Zugabe des Tracers (100  $\mu$ L) beginnt die zeitkritische Phase. Der Tracer muß unbedingt im gleichen Zeit-Schema zugegeben werden, wie der "Washer" die Platten wieder entleert. Um möglichst wenig Diskriminierungsprobleme zwischen vorderen und hinteren Spalten zu bekommen, sollte der Washer die Platte zügig durchwaschen ("Plate-Mode"). Besitzt man einem 8-Kanal-Washer, so bietet sich die Verwendung einer 8-Kanal-Pipette an. Ein bisher nicht ideal gelöster Punkt ist die Durchmischung. Da zwei unterschiedliche Flüssigkeiten in einer Kavität vorhanden sind, ist eine gute Durchmischung essentiell. Wartet man aber mit dem Mischen, bis man die ganze Platte pipettiert hat, so werden die ersten Spalten relativ früher geschüttelt, als die letzten. Minimiert wird dieses Problem durch heftiges Pipettieren, das an sich schon einen beträchtlichen Mischeffekt haben kann (Vorsicht, nicht spritzen!). Eine weitere Lösung ist die Verwendung eines Vibromischers. Man stellt die Platte direkt auf den Mischer und pipettiert während des Betriebs. Durch die geringe Amplitude dieser Geräte ist ein Pipettieren problemlos möglich. Auf jeden Fall sollte über die ganze Inkubationszeit geschüttelt werden, um Konzentrationsgradienten abzubauen. Die Kontrolle der Tracerinkubationszeit ist aus unterschiedlichsten Gründen notwendig, u.a. wird der Testmittelpunkt durch die Inkubationszeit beeinflusst. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird wieder gewaschen, wobei der Zeitpunkt des Waschens, das genaue Ende der Inkubationszeit definiert. Auch hier ist ein Ausklopfen anhaftender Flüssigkeit ratsam.

Das Waschen kann durchaus auch manuell (ohne automatischem Washer) erfolgen. In bestimmten kritischen Fällen kann manuelles Waschen sogar bessere Ergebnisse liefern, da die Flüssigkeit über den Rand der Kavitäten läuft und damit auch versehentlich verspritzten Tracer entfernt. Zum manuellen Waschen wird die Platte im Ausguß mit einer schnellen Handbewegung gestürzt und geleert. Anschließend wird Waschpuffer aus einem Becherglas auf die Platte gegossen, bis jede Kavität gefüllt und die Oberfläche vollständig mit Puffer benetzt ist. Das Leeren und Füllen wird noch dreimal wiederholt. Dann wird die Platte mit einem Tuch gründlich abgetrocknet (Boden muß "optisch" sauber sein) und ausgeklopft.

Entwicklung: Das Substrat muß unmittelbar vor dem Pipettieren frisch vorbereitet werden, da sonst eine langsame, spontane Blaufärbung auftritt. Man legt 25 ml Substratpuffer vor und gibt 100  $\mu$ L Wasserstoffperoxidlösung hinzu. Dann läßt man 200 (bis 500)  $\mu$ L TMB-Lösung unter starkem Rühren langsam einfließen. Eintropfen oder rasches Zugeben ist zu vermeiden, da sonst aus der lokal übersättigten Lösung TMB ausfallen kann, das nicht mehr in Lösung gebracht werden kann. In diesem Fall (Trübung) sollte die Lösung neu angesetzt werden. Tritt das Problem erst in der Mikrotiterplatte auf, so kann man die Platte nochmals waschen und neues Substrat zugeben. Die Zugabe des Substrats (200  $\mu$ L) erfolgt gleichfalls unter genauer Zeitkontrolle. D.h. die Spalten bzw. Reihen der Platte werden in festen Zeitabständen mit Substratlösung gefüllt und mit den gleichen Zeitabständen abgestoppt. Auch hier ist kontinuierliches Schütteln von Vorteil.

Treten bei einer MTP auffällige "Flecken", d.h. einzelne Kavitäten mit ungewöhnlich hohen Absorptionen auf, so ist meistens ungenügendes Waschen die Ursache. Die Platte kann einfach durch erneutes Waschen (evtl. manuell mit einem Becherglas Waschpuffer) oft gerettet werden. Sind streifenförmige Unregelmäßigkeiten vorhanden, so kann es sich u.a. um einen Randeffect handeln (z.B. Temperatur ungleichmäßig) oder um ein Problem mit dem "Washer" (Dispensiernadel verstopft). Fehlende Farbentwicklung bei optimierten Tests ist fast immer auf vergessene Reagenzien (oder falsche Konzentration) zurückzuführen. Bewährt hat sich die Angewohnheit, von Tracer und Substrat jeweils eine Probe aufzubewahren bis der Test erfolgreich abgeschlossen ist. Treten Probleme auf ("keine Farbe"), so kann der Fehler leichter lokalisiert werden. Vermischt man Tracer und Substrat, so sollte sich rasch eine kräftige Blaufärbung einstellen. Geschieht das nicht, so kann man das Substrat durch Zugabe von Peroxidase und den Tracer durch Zugabe von frischem Substrat überprüfen. Sollte nur das Substrat fehlerhaft gewesen sein, so kann wiederum durch nochmaliges Waschen der Entwicklungsschritt wiederholt werden.

Ein hartnäckiges Problem stellt der mikrobielle Befall des Substratpuffers dar. Da Citronensäure häufig biotechnologisch (unter unsterilen Bedingungen) aus Melasse mittels des Schimmelpilzes *Aspergillus niger* hergestellt wird [460], ist es wahrscheinlich, daß Verunreinigungen aus dem Produktionsprozeß eine Kontamination der Citrat-Puffer verursachen. Aus zahlreichen Vorversuchen ging Sorbinsäure als effektivster Konservierungsstoff hervor. Daher wird dem hier verwendeten Substratpuffer Sorbinsäure zugesetzt (siehe S. 249).

**Abstoppen:** Nach ca. 5 bis 40 min kann die Reaktion abgestoppt werden. Die Entwicklungsdauer kann durchaus im obigen Zeitrahmen der Farbstoffentwicklung angepaßt werden. Das Abstoppen erfolgt mit 100  $\mu$ L verdünnter Schwefelsäure genau nach demselben Zeitschema das zum Pipettieren des Substrats verwendet wurde. Vor der Messung muß die Platte wieder ausreichend geschüttelt werden. Eine Platte, deren Farbstoffentwicklung hinter den Erwartungen zurückbleibt, sollte auf jeden Fall spätestens nach ca. 45 min abgestoppt werden, da die Peroxidase langsam ihre Aktivität verliert. Längere Entwicklungszeiten erhöhen nur noch den unspezifischen Anteil der Farbentwicklung. Platten, deren maximale Absorption  $< 0.5$  beträgt, sollten nicht unbesehen verworfen werden. Die statistische Auswertung ergibt oft, daß auch bei niedrigen Absorptionen verläßliche Eichkurven erhalten werden können, denn die Absorptionsmessung ist selten fehlerbestimmend.

**Messung:** Die abgestoppten MTP sollten alsbald vermessen werden, da der entstehende gelbe Farbstoff nicht völlig stabil ist. Sinnvoll erscheint eine Messung bei zwei Wellenlängen, wobei eine Wellenlänge in einem schwach absorbierenden Bereich liegen sollte. Durch die Subtraktion der Absorption der Referenzwellenlänge werden kleine optische Fehler der MTP ausgeglichen. Es hat sich bewährt, von jeder Platte die Rohdaten auszudrucken. Auf diese Weise können eventuell später entdeckte Probleme am einfachsten zurückverfolgt werden.



Auswertung: Für Routineanalysen reichen viele der Programme völlig aus, die den "Readern" mitgeliefert werden. Möchte man jedoch weitgehendste Kontrolle über Daten und Auswertung, so empfiehlt sich der Weg über ASCII<sup>21</sup>-Dateien, die bei dem verwendeten "Reader" zugänglich sein sollten. Die ASCII-Rohdaten kann man in fast jedes Programm laden, das eine Auswertung von numerischen Daten erlaubt. In den meisten Fällen sind Replikate mit  $n=3$  angemessen, wobei sich die Verwendung des Medians statt des üblichen arithmetischen Mittels bewährt hat.

## 5.2 Pseudohomogener Test

Der pseudohomogene Test basiert im Prinzip auf den gleichen Vorgängen, wie sie im Standard-ELISA ablaufen. Der Unterschied ist, daß man eine zweite Platte benötigt, die mit Anti-Antikörper-Serum beschichtet wurde. Begonnen wird jedoch in einer Platte, die mit BSA oder ähnlichem geblockt wurde. Dann werden 100  $\mu\text{L}$  Probe und anschließend 100  $\mu\text{L}$  Tracer (PBS/BSA) zugegeben. Nach gründlichem Mischen gibt man 100  $\mu\text{L}$  des analytbindenden Antikörpers (PBS) zu. Man schüttelt und wartet die Inkubationszeit ab. Danach wird ein konstanter Anteil (200  $\mu\text{L}$ ) des Platteninhalts auf die gerade gewaschene anti-Antikörper-Platte übertragen. Nach kurzer Nachinkubation wird gewaschen und wie üblich entwickelt.

## 5.3 Inverse Eichkurven

Auch inverse Eichkurven werden mit einer Methode erhalten, die der Standardprozedur in vielen Punkten ähnelt. Man beginnt den Test wie üblich bis zur Tracerzugabe. Nur statt Tracer gibt man das BSA-Triazin-Konjugat zu. Nach einer Inkubation und einem Waschschrift gibt man je 200  $\mu\text{L}$  Tracer zu. Nach einer weiteren Inkubation wird wieder gewaschen und entwickelt.

## 5.4 Dissoziationsexperimente (Tracer)

Man coatet Platten wie oben beschrieben. Dann gibt man 200 bis 300  $\mu\text{L}$  Tracer (PBS/BSA) zu und inkubiert mindestens 12 Stunden um ein quasi-Gleichgewicht zu erhalten. Dann werden die einzelnen Plattenspalten zeitprogrammiert gewaschen, wobei der Waschschrift den Beginn der Dissoziation festlegt. Die schon vorher gewaschenen Spalten werden bei weiteren Waschschriften wieder mitgewaschen, was  $[T] = 0$  weitgehend garantiert. Problematisch sind eventuelle Aktivitätsverluste des Enzyms. Ein Abwaschen des Antikörpers ist dagegen bei gut vorgewaschenen Platten nicht zu befürchten.

---

<sup>21</sup> Weit verbreitetes Standard-Datenformat.

### **5.5 Dissoziationsexperimente (Analyt)**

Die Platte wird wie bei der Standardprozedur mit Eichstandards vorinkubiert, wobei die Konzentrationen reihenweise zunehmen (8 Konzentrationen). Dann wird eine größere Menge Tracer vorbereitet und in eine Vorratsflasche des Washers gefüllt. Nach dem Spülen der Schläuche ("Rinse"-Modus) mit Tracer kann die erste Spalte gewaschen werden. Nach einem Zeitprogramm ähnlich wie bei Tracer-Dissoziationsexperimenten werden die folgenden Spalten gewaschen. Nach der letzten Spalte wird die Platte durch ruckartiges Stürzen geleert und am besten manuell mit einem großen Becherglas voll Waschpuffer gründlich gewaschen. Dieser Vorgang entscheidet über die kürzeste mögliche Dissoziationsdauer. Nach dem Waschen wird wie üblich entwickelt.

### **5.6 Assoziationsexperimente (Tracer)**

Eine MTP wird gecoatet wie in der Standardvorschrift beschrieben. Um ein Austrocknen zu vermeiden, werden jeweils 100  $\mu\text{L}$  PBS vorgelegt. Dann wird nach Zeitprogramm Tracer zupipettiert. Da dies in jeder Kavität einzeln geschehen kann, stehen 96 unterschiedliche Inkubationszeiten zur Verfügung. Zwischen jeder Tracerzugabe (oder simultan) sollte geschüttelt werden. Am Ende wird die Platte am besten manuell schnell und gründlich gewaschen und entwickelt.

### **5.7 Tracer-Bindungsverhalten**

Die MTP werden wie üblich mit Antikörpern beschichtet. Dann werden 200  $\mu\text{L}$  PBS vorgelegt (Schütteln). Je 50  $\mu\text{L}$  der stabilisierten (BSA, Häm) Enzymtracer, deren Konzentration über die Soret-Bande auf ungefähr  $1 \cdot 10^{-9}$  mol/L eingestellt wurden, werden zügig zugegeben. Nach einer standardisierten Inkubationszeit von 30 min (Schütteln) wird gewaschen und entwickelt.

### **5.8 Screening von monoklonalen Antikörpern**

MTP werden mit 200  $\mu\text{L}$  Anti-Maus-IgG (1:5000) 12 h gecoatet und gewaschen. Diese vorbeschichteten Platten können gegebenenfalls auch getrocknet aufbewahrt werden (vgl. S. 235). Die getrockneten Platten sollten vorgewaschen werden. Dann wird in jede Kavität 200  $\mu\text{L}$  Zellkulturüberstand gefüllt. Falls vorhanden erhalten einige Kavitäten PBS-Lösungen von bekannten Referenzantikörpern. Diese können mindestens 1:400 verdünnt werden. Die Antikörper werden 1 h schüttelnd inkubiert. (Falls weitere Tests geplant sind, kann der Platteninhalt auch auf eine weitere Anti-Maus-IgG-Platte übertragen werden.) Die beschichtete Platte wird gewaschen und mit 200  $\mu\text{L}$  MIX10-POD-Tracer 1:10.000 für 20 min inkubiert. Nach maschinellm Waschen kann ein manueller Waschschrift angefügt werden,

um Tracer-Spritzer sicher zu entfernen. Dies empfiehlt sich besonders, falls keine Replikate gemessen werden. Die Entwicklung wird nach der Standardvorschrift vorgenommen.

### 5.9 Stabilisierung (Tracer)

Der i-Pr/Cl/C6-Tracer W-POD01C wurde 1:200.000 im jeweiligen Stabilisierungspuffer verdünnt. Davon wurden 50  $\mu\text{L}$  in einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Dazu kommen 200  $\mu\text{L}$  des üblichen Substrats (25 mL Substratpuffer pH 3.7, 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung und 200  $\mu\text{L}$  TMB-Lösung). Die Platte wurde kurz geschüttelt und im Kinetik-Modus bei 620 nm (492 nm Referenzwellenlänge) vermessen. Von den 50 Datenpunkten (Zeitinkrement 20 s) wurde ein linearer Abschnitt von 10 Punkten zur Berechnung der Steigung herangezogen.

### 5.10 Messung der Enzymaktivität (Peroxidase)

1 L PBS wird mit 100 mg BSA versetzt. Je 10 mL werden in kleine Schnappdeckelgläschen gefüllt. Die Peroxidase-Tracer ( $A_{403} \approx 1.0$ ) werden 1:100.000 verdünnt. Dies kann z.B. in zwei Stufen (20  $\mu\text{L}$  in 10 mL, dann 50  $\mu\text{L}$  in 10 mL) durchgeführt werden. Von der verdünnten Tracerlösung werden 100  $\mu\text{L}$  in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 200  $\mu\text{L}$  Substrat versetzt. Nach kurzem, intensivem Durchmischen (Rüttler) wird die Entwicklung des blauen Farbstoffs bei 620 nm (Referenzwellenlänge 492 nm) im Kinetikmodus des Readers verfolgt. Zur Auswertung werden 30 Punkte des linearen Teils der Kurve verwendet. Die Steigung ist proportional zur Enzymaktivität. Eine Umrechnung in "units" ist nicht möglich und meistens auch nicht erforderlich. Wenn Standard-"units" benötigt werden, muß ein entsprechender Standard-Test (z.B. mit ABTS) verwendet werden.

## 6 Synthesen

### 6.1 Synthesevorschrift für symmetrische Triazine: Et/Et/Cl (Simazin) und Me/Me/Cl.

30 g (163 mmol) Cyanurchlorid werden in 100 mL Glyme (Dimethoxyethan) gelöst. Langsam werden 52.4 mL (652 mmol) 70%iges Ethylamin unter Rühren zugetropft. Die Mischung wird nach 1 h für 30 min auf 30 °C erwärmt. Dann werden 300 ml kaltes, demineralisiertes Wasser zugegeben. Der weiße Niederschlag wird abfiltriert, in DMSO umkristallisiert (Simazin) und mit Aceton nachgewaschen (Simazin). Für besser lösliche Derivate ist auch Umkristallisieren in Methanol geeignet. Eine ähnliche Vorschrift wurde von SCHNEIDER [461] zur Synthese der symmetrischen Cyclopropyl- und Cyclopentyl-Derivate verwendet.

Gesamtausbeute Simazin ( $M_r$  201.7): 23.5 g (71.5 %). Fp. (1. Frakt.) 228 °C (225-227 °C [462]), DC (II)<sup>22</sup>  $R_f=0.42$ , GC-MSD<sup>23</sup> RTime 10.33 min,  $m/z=201$  (186, 173)

Ausbeute Me/Me/Cl ( $M_r$  173.6): 1. Frakt. 1.3 g (27.6 %) Fp. 294-296 °C, DC (II)  $R_f=0.24$ , GC-NPD<sup>24</sup> RTime 17.95 min, GC-MSD RTime 9.84 min,  $m/z=173$  (144)

### 6.2 Synthesevorschrift A für unsymmetrische Triazine: i-Pr/Et/Cl (Atrazin) und t-Bu/Et/Cl (Terbuthylazin).

10 g (54 mmol) Cyanurchlorid werden in 100 mL Aceton gelöst und auf -10 °C abgekühlt. 9.3 mL (108 mmol) Isopropylamin werden mit 20 mL Aceton gemischt, vorgekühlt und langsam unter starkem Rühren zugetropft. Die Temperatur soll nicht über 0 °C steigen. Die Wärmetönung ist eine gute Kontrolle über den Verlauf der Reaktion. Steigt die Temperatur nach Zugabe von Amin nicht mehr an, ist das erste Äquivalent Chlor des Cyanurchlorids verbraucht. Die Temperatur kann mittels eines elektronischen Thermometers (Auflösung 0.1 °C) verfolgt werden. Nach dieser ersten Reaktionsstufe wird die Mischung kalt abfiltriert und der Rückstand mit Aceton nachgewaschen. Das Filtrat wird unter Rühren mit 8.7 ml (108 mmol) 70%igem Ethylamin versetzt und langsam auf 30 °C angewärmt. Nach 1 h wird mit einem Streifen feuchtem pH-Papier auf einen Überschuss desamins geprüft. Ist keine Base mehr vorhanden, so sollte Ethylamin nachdosiert werden. Die Reaktionsmischung

---

<sup>22</sup> Vorschriften zur Dünnschichtchromatographie (DC) siehe Abschnitt 7 dieses Kapitels. Abkürzungen und Erklärungen der Begriffe siehe Kapitel VIII und IX.

<sup>23</sup> Die GC-MSD-Untersuchungen wurden dankenswerterweise von Herrn C. Zwiener durchgeführt.

<sup>24</sup> Die GC-NPD-Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn R. J. Schneider durchgeführt.

wird mit 300 mL kaltem demin. Wasser versetzt. Der weiße Niederschlag wird abfiltriert und in Methanol umkristallisiert.

Variante: Für teure Amine kann ein Äquivalent des Amins, das als Base verbraucht wird, z.B. durch Triethylamin ersetzt werden.

Atrazin ( $M_r$  215.7): Fp. (1. Frakt.) 173 °C (175-177 [462]), DC (I)  $R_f=0.72$ , DC (II)  $R_f=0.53$ , DC (III)  $R_f=0.79$ , DC (IV)  $R_f=0.85$ , DC (VI)  $R_f=0.31$ , DC (VII)  $R_f=0.93$ , GC-MSD RTime 10.42 min,  $m/z=215$  (200, 173).

Terbutylazin ( $M_r$  229.7): Fp. 177 °C (177-179 [462]), DC (I)  $R_f=0.76$ , DC (II)  $R_f=0.42$ , DC (IV)  $R_f=0.85$ , GC-NPD RTime 21.96 min.

### 6.3 Synthesevorschrift B für unsymmetrische Triazine: i-Pr/n-Pentyl/Cl ("n-Pentylatrazin").

10 g (54 mmol) Cyanurchlorid werden mit 250 mL tert-Butylmethylether versetzt und auf -10 °C abgekühlt. 9.3 mL (108 mmol) Isopropylamin werden mit 100 mL demin. Wasser gemischt, vorgekühlt und langsam eingetropft. Die Temperatur soll nicht über 0 °C steigen. Nach der Zugabe des Amins wird noch 30 min weitergerührt. Der Kolbeninhalt wird im Scheidetrichter getrennt und die etherische Phase mit Gemisch aus 12.7 mL (108 mmol) Pentylamin und 100 mL demin. Wasser langsam versetzt. Die Temperatur sollte unter 30 °C bleiben. Es wurde bei Raumtemperatur über Nacht weitergerührt. Die etherische Phase wird abgetrennt, mit Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Das Produkt kann vorteilhaft in Methanol umkristallisiert werden.

Gesamtausbeute "n-Pentylatrazin" ( $M_r$  257.8): 13 g (93.3%). Fp. 1. Frakt. 89.5-92 °C, DC (I)  $R_f=0.79$ , DC (II)  $R_f=0.65$ , DC (III)  $R_f=0.83$ , GC-NPD RTime 28.14 min, GC-MSD RTime 11.97 min,  $m/z=257$  (242, 228, 214, 200, 187, 172, 158).

### 6.4 Synthesevorschrift C für unsymmetrische Triazine: i-Pr/Et/Cl (Atrazin).

20 g (108 mmol) Cyanurchlorid werden mit 250 mL tert-Butylmethylether versetzt und auf -10 °C abgekühlt. 9.3 mL (108 mmol) Isopropylamin werden mit 100 mL Wasser gemischt, vorgekühlt und langsam zugetropft. Die Temperatur darf 0 °C nicht übersteigen. 45 g (326 mmol) Kaliumcarbonat werden in 150 mL demin. Wasser gelöst, vorgekühlt und langsam zugetropft ( $T < 0$  °C). Die Mischung wird 1 h kräftig weitergerührt. Dann werden 8.67 mL (108 mmol) 70%iges Ethylamin mit 20 mL demin. Wasser gemischt und langsam zugetropft. Nach mehreren Stunden Rühren bei Raumtemperatur (über Nacht) hat sich ein weißer Niederschlag in der etherischen Phase gebildet. Die Mischung wird abfiltriert und die

etherische Phase abgetrennt und einrotiert. Das Produkt (Filterkuchen und Rückstand) kann gut in Methanol umkristallisiert werden.

Rohausbeute i-Pr/Et/Cl, Atrazin ( $M_r$  215.7): 21.3 g (91.4 %), Fp. 1. Frakt. 175 °C (175-177 [462]), DC (I)  $R_f=0.72$ , DC (II)  $R_f=0.53$ , DC (III)  $R_f=0.79$ , DC (IV)  $R_f=0.85$ , DC (VI)  $R_f=0.31$ , DC (VII)  $R_f=0.93$ , GC-MSD RTime 10.42 min,  $m/z=215$  (200, 173).

Rohausbeute i-Pr/Me/Cl, "Methylatrazin" ( $M_r$  201.7): -, Fp. 1. Frakt. 160-162 °C, DC (I)  $R_f=0.69$ , DC (II)  $R_f=0.44$ , GC-NPD RTime 19.52 min, GC-MSD RTime 10.16 min,  $m/z=201$  (186).

Ausbeute i-Pr/n-Pr/Cl, "n-Propyl-Atrazin" ( $M_r$  229.7): 1. Frakt. 1.7 g (27.4 %), Fp. 157-159 °C, DC (I)  $R_f=0.76$ , DC (II)  $R_f=0.57$ , GC-NPD RTime 21.99 min, GC-MSD RTime 10.91 min,  $m/z=229$  (214, 200, 187, 172, 158).

Ausbeute i-Pr/n-Bu/Cl, "n-Butyl-Atrazin" ( $M_r$  243.7): 1. Frakt. 1.5 g (11.4 %), Fp. 108 °C, DC (II)  $R_f=0.63$ , GC-NPD RTime 26.42 min, GC-MSD RTime 11.46 min,  $m/z=243$  (228, 214, 200, 187, 172, 158).

Ausbeute i-Pr/n-Hexyl/Cl, "Hexylatrazin" ( $M_r$  271.8): 1. Frakt. 2.3 g (31.2 %), Fp. 90-92 °C, DC (I)  $R_f=0.80$ , DC (II)  $R_f=0.68$ , GC-NPD RTime 37.14 min, GC-MSD RTime 12.47 min,  $m/z=271$  (256, 242, 228, 214, 200, 187, 172, 158).

## 6.5 Synthese von i-Pr/Et/1,3DAP ("1,3-Diaminopropyl-Atrazin")

3 g (14 mmol) Atrazin, 10 mL (120 mmol) 1,3-Diaminopropan und 50 mL Wasser werden 1 h zum Sieden erhitzt. Die Mischung wird an der Luft partiell eingedunstet und mit halbkonzentrierter Natriumsulfat-Lösung versetzt, um eine Phasentrennung zu erleichtern. Nach einer kurzen Zentrifugation wird die ölige Schicht abpipettiert, in Methanol aufgenommen, mit Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Die Mischung wird auf Kieselgel 60 (Korngröße 0.063 bis 0.200 mm, Säule 25 cm,  $\phi$  4.2 cm) mit basischem Laufmittel (80 Vol% Ethanol, 10 Vol% Ammoniaklösung (25 %ig), 10 Vol% dest. Wasser) gereinigt. Durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (HPTLC) werden die Fraktionen ermittelt, die reines Produkt enthalten. Diese Fraktionen werden vereinigt und vom Lösungsmittel befreit. Eine analoge Synthese wurde mit 1,8-Diaminooctan durchgeführt.

Ausbeute i-Pr/Et/1,3DAP ( $M_r$  253.4): 485 mg (13.7 %), Fp. 48 °C, DC (VIII)  $R_f=0.54$ , GC-MS:  $m/z=254$ .

Ausbeute i-Pr/Et/1,8DAO ( $M_r$  323.5): 480 mg (10.6 %), Fp. - (zähflüssig), DC (VIII)  $R_f=0.78$ .

### 6.6 Synthese von t-Bu/Et/C6 und i-Pr/Et/C6 (aus t-Bu/Et/Cl (Terbuthylazin) bzw. i-Pr/Et/Cl (Atrazin))

10 g (44 mmol) Terbuthylazin werden in 20 mL DMSO aufgelöst. 10 g (76 mmol) 6-Aminohexansäure und 10 g (72 mmol) Kaliumcarbonat werden in 150 mL demin. Wasser gelöst. Die Terbuthylazin-Lösung wird unter starkem Rühren in die wässrige Lösung gegeben. Die trübe Mischung wird mindestens 1 h am Sieden gehalten. Wenn eine dünnschichtchromatographische Kontrolle einen weitgehenden Umsatz zeigt, wird die Reaktion abgebrochen. Die abgekühlte Mischung (basisch) wird mit tert-Butylmethylether mehrfach ausgeschüttelt. Die Extrakte werden verworfen. Dann wird die wässrige Lösung mit Eisessig oder Ameisensäure auf pH 3-4 gebracht und wieder mit tert-Butylmethylether extrahiert. Da auch Triazine protoniert werden können, ist der optimale pH-Wert von großer Bedeutung. Im Einzelfall kann Extraktion bei verschiedenen pH-Werten angebracht sein, um die Ausbeute zu erhöhen. Die Extrakte werden vereinigt, getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Wiederholtes Auflösen und Ausethern erbringt einen guten Reinigungseffekt.

Ausbeute t-Bu/Et/C6 ( $M_r$  324.4): 1. Fraktion 3.1 g (21.7 %) Fp. 119-123 °C, DC (I)  $R_f=0.12$ , FAB-MS<sup>25</sup> (Matrix: G/TG):  $m/z=325$  ( $M^+ + H$ ).

### 6.7 Synthese von i-Pr/Et/C6 (aus i-Pr/Cl/C6)

2.6 g (8.6 mmol) i-Pr/Cl/C6 werden mit 7 mL (86 mmol) 70%igem Ethylamin versetzt und mit 10 mL Wasser am Rückfluß erhitzt. Nach 30 min werden weitere 3 mL (37 mmol) Ethylamin zugegeben. Es wird weitere 60 min am Sieden gehalten. Nach dem Abkühlen wird mit 300 mL Wasser aufgefüllt, mit Eisessig leicht angesäuert und mit tert-Butylmethylether Produkt extrahiert. Eine Reinigung des öligen Produkts kann entweder durch wiederholte Umfällung in Aceton bzw. Wasser erreicht werden oder (besser) durch Auflösen in basischer Lösung und Ausethern.

Rohausbeute i-Pr/Et/C6 ( $M_r$  310.4): 1.2 g (45.0 %), Fp. 96 °C, MS(EI): (200 °C)  $m/z=310$  (295, 215).

### 6.8 Synthese von i-Pr/Cl/C6 und analoger Triazincarbonsäuren

10 g Cyanurchlorid (54 mmol) werden in 50 mL Glyme gelöst und auf -10 °C abgekühlt. 9.3 mL (108 mmol) Isopropylamin werden mit 10 mL Glyme gemischt und vorsichtig unter starkem Rühren zugetropft. Die Temperatur soll nicht über 0 °C steigen. Die Mischung wird 30 min bei 0 °C gerührt, kalt abfiltriert und mit Glyme nachgewaschen. 7.11 g (54 mmol)

---

<sup>25</sup> Die FAB-MS- sowie die (EI-)MS-Messungen wurden dankenswerterweise von Frau B. Silbernagel (TU München) durchgeführt.

6-Aminohexansäure werden mit 20 g (145 mmol) Kaliumcarbonat vermischt und in 50 mL demin. Wasser gelöst. Die wässrige Lösung wird zum Filtrat gegeben und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird für 1 h auf 30 °C erwärmt. Die Lösung wird mit ca. dem gleichem Volumen Wasser versetzt und der pH-Wert mit Eisessig auf ca. 3 eingestellt. Der weiße Niederschlag wird abfiltriert und z.B. in Glyme umkristallisiert. Weiteres Produkt kann durch Wasserzugabe oder Extraktion mit tert-Butylmethylether gewonnen werden. Auflösen und Ausethern führt zu einem guten Reinigungseffekt.

Rohausbeute i-Pr/Cl/C6 ( $M_r$  301.8): 12,4 g (76.1 %), Fp. 1. Frakt. 172-174 °C (161-162 °C [193]), %C: 47.9 (th. 47.8) %H: 7.0 (th. 6.7) %N 23.3 (th. 23.2), DC (I)  $R_f=0.58$ , DC (III)  $R_f=0.48$ , DC (IV)  $R_f=0.77$ , DC (VI)  $R_f=0.35$ , DC (VII)  $R_f=0.91$ , MS(EI):  $m/z=301$  (286, 265, 242, 228, 214, 200, 187, 172, 158), FAB-MS (Matrix: G/TG):  $m/z=302$  ( $M^+ + H$ ).

Ausbeute t-Bu/Cl/C6 ( $M_r$  315.8): 9.3 g (54.5 %) Fp. 1. Frakt. 167 °C, DC (I)  $R_f=0.59$ , FAB-MS (Matrix: G/TG):  $m/z=316$  ( $M^+ + H$ ).

Ausbeute c-Pentyl/Cl/C6 ( $M_r$  327.8): 7.5 g (42.4 %) Fp. 1. Frakt. 180 °C.

## 6.9 Synthese von i-Pr/Cl/C3

15 g (81 mmol) Cyanurchlorid werden mit 150 mL tert-Butylmethylether versetzt und auf -10 °C abgekühlt. 7.7 mL (90 mmol) Isopropylamin und 12.4 g Kaliumcarbonat werden in 20 mL Wasser und 10 g Eis gelöst und langsam zugetropft ( $T < 0$  °C). Nach 30 min wird die wässrige Phase abgetrennt. Zur organischen Phase gibt man eine Mischung aus 12 g (135 mmol)  $\beta$ -Alanin (3-Aminopropansäure), 15 g (109 mmol) Kaliumcarbonat und 50 mL demin. Wasser. Bei 30 °C wird eine Stunde, bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Mischung wird mit Ameisensäure angesäuert und mit tert-Butylmethylether ausgeethert. Das Rohprodukt kann in Methanol/Acetonitril/Wasser umkristallisiert werden.

Ausbeute i-Pr/Cl/C3 (259.6): 1. Frakt. 1.1 g (5.2 %), Fp. 279-281.5 °C, DC (I)  $R_f=0.47$ .

## 6.10 Synthese von c-Pr/Cl/C6 (teure Amine)

5 g (27 mmol) Cyanurchlorid werden in 25 mL Glyme gelöst und auf -10 °C abgekühlt. 1.9 mL Cyclopropylamin und 4 mL Triethylamin werden mit 20 mL Glyme gemischt, vorgekühlt und langsam unter Temperaturkontrolle und starkem Rühren zugetropft. 5 g Aminohexansäure werden mit 10 g Kaliumcarbonat gemischt und in 25 mL demin. Wasser gelöst. Diese Lösung wird bei 0-10 °C zugetropft und die Reaktionsmischung für 1 h auf 30 °C erwärmt. Dann wird Wasser zugegeben (75 mL) und mit Eisessig vorsichtig angesäuert. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in Glyme umkristallisiert.

Ausbeute c-Pr/Cl/C6 ( $M_r$  299.8): 1. Frakt. 2.9 g (35.8 %), Fp. 165 °C.



### 6.11 Synthese von Et/Cl/C6 (gasförmige Amine)

5 g (27 mmol) Cyanurchlorid werden in 100 mL Aceton gelöst und auf  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. 100 mL Ethylamin (70% in Wasser) werden mit 100 mL Aceton gemischt und mit Natriumsulfat getrocknet. Ca. 12 ml des Filtrats wird langsam zur Cyanurchloridlösung getropft. Die Temperatur soll  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  nicht übersteigen. Der Endpunkt kann leicht an der Wärmetönung der Reaktion erkannt werden. Die Mischung wird kalt abfiltriert. Das Filtrat wird mit einer Lösung aus 50 mL Wasser, 20 g Kaliumcarbonat und 6-Aminohexansäure vermischt. Der Kolben wird auf  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Nach 2 h wird eine dünnschichtchromatographische Kontrolle durchgeführt. Wenn die Reaktion eine ausreichende Menge Produkt ergeben hat, wird die Mischung mit Wasser versetzt und mit Ameisensäure auf ca. pH 3 gebracht. Der Niederschlag wird in Glyme/Wasser mit Kaliumcarbonatzusatz wiederaufgenommen und mit verdünnter Ameisensäure ausgefällt. Eine weitergehende Reinigung kann durch Ausethern erreicht werden.

Ausbeute Et/Cl/C6 ( $M_r$  287.8): 1. Frakt. 1.3 g (16.7 %) Fp.  $141.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $140.5\text{-}142.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  [193]), FAB-MS (Matrix: NBA):  $m/z=288$  ( $M^+ + H$ ).

### 6.12 Synthese von i-Pr/Cl/C6-C6

1000 mg (3.3 mmol) i-Pr/Cl/C6 werden mit 1000 mg Natriumsulfat, 418 mg (3,63 mmol) NHS und 17 mL Glyme (trocken) versetzt. Zu der trüben Mischung, die auf  $< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt wurde, werden 681 mg (3.3 mmol) DCC (allergen!) zugegeben. Nach 1 h Rühren läßt man sich die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmen. Der ausfallende Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert. 952 mg (7.26 mmol) 6-Aminohexansäure werden mit 1002 mg (7.26 mmol) Kaliumcarbonat in 4 mL demin. Wasser gelöst und zu der NHS-Ester-Mischung gegeben. Nach mehreren Stunden Rühren wird mit verd. Essigsäure angesäuert und der Niederschlag abfiltriert und gewaschen. Das Produkt kann in Glyme umkristallisiert werden.

Rohausbeute i-Pr/Cl/C6-C6 ( $M_r$  414.9): 700 mg (51.1 %), Fp.  $154\text{-}156\text{ }^{\circ}\text{C}$ , DC (III)  $R_f=0.39$ , DC (IV)  $R_f=0.47$ , MS(EI): ( $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ )  $m/z=414$  (286).

### 6.13 Synthese von i-Pr/Cl/C6-C2

1000 mg (3.3 mmol) i-Pr/Cl/C6 werden mit 1000 mg Natriumsulfat, 418 mg (3.63 mmol) NHS und 10 mL DMF versetzt. Die Mischung wird auf  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Dann werden 681 mg (3.3 mmol) DCC (Allergen!) zugegeben und es wird 2 h bei  $< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$  sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Ausfallender Dicyclohexylharnstoff sollte abfiltriert oder abzentrifugiert werden. 497 mg (6.63 mmol) Glycin (2-Aminoethansäure) und 916 mg (6.63 mmol) Kaliumcarbonat werden in 30 mL Wasser gelöst. Die NHS-Ester-Lösung wird unter starkem Rühren in die wässrige Lösung eingetropft. Nach 2 Tagen bei Raumtemperatur

wird filtriert und mit verd. HCl angesäuert. Der weiße Niederschlag wird abfiltriert und mit Wasser nachgewaschen. Das Produkt kann in Glyme umkristallisiert werden.

Rohausbeute i-Pr/Cl/C6-C2 ( $M_r$  358.8): 500 mg (42.2 %), Fp. 174 °C, DC (I)  $R_f=0.08$ , DC (III)  $R_f=0.31$ , DC (IV)  $R_f=0.31$ , FAB-MS (Matrix: G/TG):  $m/z=359$  ( $M^+ + H$ ), FAB-MS (Matrix: NBA):  $m/z=381$  ( $M^+ + Na^{23}$ ).

#### 6.14 Synthese von i-Pr/Cl/C11

5 g (27 mmol) Cyanurchlorid werden mit 50 mL tert-Butylmethylether versetzt. 7 ml (81 mmol) Isopropylamin und 10 mL Wasser werden vorsichtig zu der auf -15 °C abgekühlten Cyanurchloridlösung getropft. Nach 30 min Rühren wird eine Mischung aus 8.3 g (41 mmol) 11-Aminoundecansäure, 11.3 g (82 mmol) Kaliumcarbonat, 50 mL Methanol und 100 mL demin. Wasser zugegeben. Der Ansatz wird eine Stunde bei 45 °C gerührt und weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die Reaktionsmischung wird mit Ameisensäure angesäuert und langsam eingedunstet. Der Niederschlag wird abgenutscht, mit Wasser gewaschen und in Acetonitril/DMSO/Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute i-Pr/Cl/C11 ( $M_r$  371.8): 1. Frakt. 5.6 g (55.8 %), Fp. 142-144 °C, DC (I)  $R_f=0.67$ , MS(EI):  $m/z=371$  (356, 312, 298, 284, 270, 256, 242, 228, 214, 200, 187, 172, 158).

#### 6.15 Synthese von i-Pr/SMe/C6

11.4 g (58.1 mmol) Dichlor-thiomethyl-triazin (MDT) werden in 30 mL Toluol gelöst. 12 mL (140 mmol) Isopropylamin werden mit 20 mL demin. Wasser gemischt und langsam zugetropft. Die Temperatur soll 50 °C nicht übersteigen. Die organische Phase wird abtrennt, mit Wasser gewaschen und mit einer Lösung aus 10.5 g (80 mmol) 6-Aminohexansäure, 22.1 g (160 mmol) Kaliumcarbonat und 40 mL demin. Wasser gemischt. Unter starkem Rühren werden die Reaktanden für 1 Stunde auf 90 °C erhitzt. Die abgekühlte Mischung wird mit 50 mL Wasser und 50 mL tert-Butylmethylether versetzt. Die etherische Phase wird verworfen. Die wässrige Phase wird mit Eisessig angesäuert und mit tert-Butylmethylether ausgeschüttelt. Diese etherische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wird in Methanol/Wasser umkristallisiert. Das Rohprodukt wird in 20%igem Methanol mit Kaliumcarbonatzusatz gelöst, zweimal mit tert-Butylmethylether gereinigt, mit Ameisensäure angesäuert und wieder mit tert-Butylmethylether extrahiert.

Ausbeute i-Pr/SMe/C6 ( $M_r$  313.4): 1. Frakt. 11.9 g (65.5 %), Fp. 80-88 °C, DC (I)  $R_f=0.46$ , MS(EI): (200 °C)  $m/z=313$  (298, 254, 240, 226, 212, 198, 184, 170).

### 6.16 Synthese von i-Pr/Et/3MPS und t-Bu/Et/3MPS

5 g (23.3 mmol) Atrazin werden in 100 mL Dioxan gelöst und mit einer Lösung aus 100 mL Wasser, 2.72 mL (31.2 mmol) 3-Mercaptopropionsäure und 15 g (108 mmol) Kaliumcarbonat gemischt und ca. 1 Stunde am Rückfluß gekocht. Um eine Oxidation der Schwefelverbindungen sicher zu unterbinden, kann der Kolben mit Stickstoff gespült werden. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur mit verd. HCl angesäuert (pH ca. 1). Es bildet sich eine geringe Menge eines gelblichen Niederschlags, der verworfen wird. Mit Kaliumcarbonatlösung wird der pH-Wert auf ca. 4 eingestellt. Der klebrige, weiße Niederschlag wird gewaschen und in Methanol umkristallisiert. Sowohl die Ausbeute, als auch die Reinheit können durch Ausethern mit tert-Butylmethylether verbessert werden.

Rohausbeute i-Pr/Et/MPS ( $M_r$  285.4): 5.4 g (81.2 %), Fp. 1. Frakt. 168-170.5 °C (165-166 °C [193]), DC (IV)  $R_f=0.30$ , MS(EI): (200 °C)  $m/z=285$  (270, 240, 213, 198).

Rohausbeute t-Bu/Et/MPS ( $M_r$  299.4): 1.4 g (20.0 %), Fp. 1. Frakt. 130-141 °C, DC (I)  $R_f=0.46$  (verunreinigt), DC (IV)  $R_f=0.65$ , FAB-MS (Matrix: G/TG):  $m/z=300$  ( $M^+ + H$ ), (verunreinigt), FAB-MS (Matrix: NBA):  $m/z=300$  ( $M^+ + H$ ), (verunreinigt).

### 6.17 Synthese von i-Pr/OH/C6 und t-Bu/OH/C6 (vgl. [187])

1 g (3.31 mmol) i-Pr/Cl/C6 wird mit 5 mL Dioxan, 5 mL Wasser und 5 mL konzentrierter Salzsäure versetzt. Nach mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur wird die Lösung in 50 mL Wasser eingegossen. Dann wird mit Kaliumcarbonatlösung vorsichtig neutralisiert und mit Ameisensäure auf ca. pH 3 eingestellt. Der weiße Niederschlag wird abfiltriert und in DMSO/Methanol (1:1) umkristallisiert. Das Produkt wird mit Wasser und tert-Butylmethylether gewaschen.

Ausbeute i-Pr/OH/C6 ( $M_r$  283.3): 600 mg (64 %), Fp. 238-239 °C, DC (I)  $R_f=0.00$ , MS(EI): (250 °C)  $m/z=283$  (268, 224, 210, 182).

Ausbeute t-Bu/OH/C6 ( $M_r$  297.4): 600 mg (60 %), Fp. 172-176 °C, DC (I)  $R_f=0.00$ , FAB-MS (Matrix: G/TG):  $m/z=298$  ( $M^+ + H$ ).

### 6.18 Synthese von t-Bu/Et/OH und Et/Et/OH

200 mg t-Bu/Et/Cl (Terbutylazin) werden in 4 mL Glyme, 1 mL dest. Wasser und 2.5 mL konzentrierter Salzsäure gelöst. Nach 3 Stunden bei Raumtemperatur wird das Produkt in 20 mL Wasser eingegossen. Es wird mit Kaliumcarbonat vorsichtig neutralisiert. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit destilliertem Wasser und wenig Glyme gewaschen.

Ausbeute t-Bu/Et/OH ( $M_r$  211.3): 173 mg (94 %), Fp. 275-280 °C, DC (I)  $R_f=0.01$  (verunreinigt mit Edukt).

Ausbeute Et/Et/OH ( $M_r$  183.3): 143 mg (79 %), Fp. > 320 °C.

### 6.19 Synthese von H/Cl/C6 und H/Cl/C11

10 g (54 mmol) Cyanurchlorid werden mit 100 mL tert-Butylmethylether versetzt und (z.B. mit Methanol/Trockeneis) auf -50 °C abgekühlt. 7.5 mL konzentrierte Ammoniaklösung (25 %ig) werden unter starkem Rühren zugetropft. Nach 5 Minuten wird die Kühlung entfernt. Die Suspension wird bei ca. 0 °C filtriert (Rückstand mit 25 mL tert-Butylmethylether nachwaschen). 13.1 g (100 mmol) 6-Aminohexansäure und 27.4 g (200 mmol) Kaliumcarbonat werden bei 30 °C in 100 mL demin. Wasser gelöst. Dann wird unter starkem Rühren das etherische Filtrat zugegeben. Nach 6 Stunden Reaktionszeit (30 °C) werden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird vorsichtig mit Ameisensäure angesäuert. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit demin. Wasser gewaschen, in 200 mL Wasser aufgeschlämmt und mit ca. 1 M Natronlauge gerade aufgelöst. Gegebenenfalls wird filtriert, dann wird die Lösung wieder angesäuert. Der abfiltrierte Niederschlag wird mit Wasser gewaschen.

Für H/Cl/C11 wurden folgende Änderungen notwendig: 20.1 g (100 mmol) 11-Aminoundecansäure werden in 27.6 mL Triethylamin, 100 mL demin. Wasser und 100 mL DMSO suspendiert. Das Rohprodukt muß zur Filtration in mehr Wasser (ca. 600 mL) verdünnt werden, ebenso beim basischen/sauren Umfällen.

**Hinweis:** 11-Aminoundecansäure ist schwer löslich in Wasser und vielen Lösungsmitteln. Dagegen löst sie sich glatt in Kalilauge (pH 14) und in verdünnter Ameisensäure. Dieses Verhalten kann genutzt werden, um unumgesetzte Aminocarbonsäure vom Produkt abzutrennen. So kann das Produkt bei pH 8 (Natriumhydrogencarbonat) extrahiert werden, ohne die Verunreinigung 11-Aminoundecansäure zu lösen. Umkristallisiert werden kann in DMSO. Die heiße Lösung wird filtriert und bei ca. 100 °C mit Wasser knapp über die beginnende Trübung versetzt. Anschließend wird mit Glyme nachgewaschen.

Ausbeute H/Cl/C6 ( $M_r$  259.7): 6.5 g (46.2 %), Fp. 167-170 °C, DC (I)  $R_f=0.26$ , FAB-MS (Matrix: G/TG):  $m/z=260$  ( $M^+ + H$ ).

Ausbeute H/Cl/C11 ( $M_r$  329.8): 6.0 g (33.5 %), Fp. 1. Frakt. 156-160 °C, DC (I)  $R_f=0.45$ , FAB-MS (Matrix: G/TG):  $m/z=330$  ( $M^+ + H$ ) (verunreinigt).

### 6.20 Synthese von H/OH/C6 und H/OH/C11

2 g (7.7 mmol) H/Cl/C6 werden in einem Gemisch aus 10 mL Glyme, 10 mL Wasser und 10 mL konzentrierter Salzsäure (mind. 37%ig) gelöst. Nach 4 Stunden Reaktion bei Raumtemperatur wird mit 100 mL Wasser verdünnt und mit Natriumhydrogencarbonat vorsichtig neutralisiert. Nach einigen Stunden wird abfiltriert und mit Glyme nachgewaschen. Das Rohprodukt kann in DMSO/Wasser umkristallisiert werden. Durch Nachwaschen mit Glyme werden letzte DMSO-Spuren entfernt.

Ausbeute H/OH/C6 ( $M_r$  241.3): 750 mg (40.4 %), Fp. 244-247 °C, DC (I)  $R_f=0.00$  (verunreinigt).

Ausbeute H/OH/C11 ( $M_r$  311.4): 1.09 g (45.5 %), Fp. 258-264 °C, DC (I)  $R_f=0.00$  (verunreinigt).

### 6.21 Synthese von Cl/C6/C6

10 g (54 mmol) Cyanurchlorid werden in 100 mL tert-Butylmethylether gelöst. Die unlöslichen Bestandteile werden abfiltriert. Die klare Lösung wird auf -10 °C abgekühlt und vorsichtig mit einer vorgekühlten Mischung aus 7.2 g (54 mmol) 6-Aminohexansäure, 10 g (72 mmol) Kaliumcarbonat und 50 mL demin. Wasser versetzt. Nach 30 Minuten Rühren wird die Kühlung entfernt. Bei ca. 10 °C werden 10 mL konzentrierte Ammoniaklösung (25%) zugegeben. Nach 10 Minuten wird langsam auf 30 °C erwärmt. Nach 2 Stunden wird mit Ameisensäure angesäuert und abfiltriert. Das Rohprodukt kann in DMSO/Wasser/Kaliumcarbonat gelöst und mit verd. Ameisensäure gefällt werden. Eine weitere Reinigung kann durch Umkristallisieren in Methanol/Aceton (1:5) erfolgen.

**Hinweis:** Diese Synthese war zur Herstellung eines Desalkyltriazin-Derivats geplant worden. Die unerwartete Richtung des Syntheseverlaufs ist wahrscheinlich auf den Phasenübergang des Zwischenprodukts aus der organischen in die wässrige Phase zurückzuführen. So erfolgt eine doppelte, statt der gewünschten unsymmetrischen Substitution. Für die gezielte Herstellung des erhaltenen Produkts ist jedoch eine wesentlich vereinfachte Synthesestrategie möglich, analog zu symmetrischen Triazinderivaten. Diese Verbindung hat eine gewisse Bedeutung als potentielle Verunreinigung von Desalkyl-Haptenen.

Ausbeute Cl/C6/C6 ( $M_r$  373.8): 5.4 g (26.8 %), Fp. 1. Frakt. 189-195 °C, DC (I)  $R_f=0.33$ , MS(EI):  $m/z=373$  (355, 314, 300, 286, 272).

### 6.22 Synthese des hydrophilen Spacers EDA-DGS

50 mL (341 mmol) 2,2'-(Ethylendioxy)diethylamin werden mit 50 mL Glyme vermischt. Eine Lösung aus 9.8 g (34 mmol) Triphenylchlormethan (Tritylchlorid) und 30 mL Glyme wird unter starkem Rühren bei Raumtemperatur langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wird 2 Stunden am Rückfluß gekocht, abgekühlt und in 500 mL demin. Wasser eingegossen. Anschließend wird mit 250 mL tert-Butylmethylether ausgeschüttelt. Die organische Phase

wird abgetrennt, mit demin. Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Die Rohausbeute des monogeschützten Diamins beträgt 96 % bezogen auf Tritylchlorid. Es läßt sich dünn-schichtchromatographisch keine Verunreinigung durch Diamin nachweisen (Ninhydrintest).

Zur etherischen Lösung werden 12 mL (86.2 mmol) Triethylamin und 5 g (43.1 mmol) Diglycolsäureanhydrid gegeben. Die Mischung wird unter starkem Rühren 10 Minuten zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 300 mL Natriumsulfatlösung (ca. 10 %ig) zugegeben. Zudem muß mit Eisessig auf pH 3 angesäuert werden. Einige Zeit nach dem Schütteln bilden sich drei Phasen: eine etherische (oben), eine wässrige (unten) und eine zähe mittlere Phase. Letztere enthält den Großteil des gewünschten Produkts. Die zähe Phase wird mit dem doppelten Volumen Glyme versetzt und filtriert. Eine Reinigung kann durch Ausschütteln mit konzentrierter Natriumsulfatlösung (angesäuert mit Eisessig) erreicht werden. Nach der Phasentrennung wird zusätzlich Glyme zugegeben um das Produkt gut zu lösen und restliches Natriumsulfat zu präzipitieren. Die Glymelösung wird mit Natriumsulfat getrocknet und mit dem gleichen Volumen Eisessig versetzt. Zur Schutzgruppenabspaltung wird diese Lösung unter Rühren zum Sieden erhitzt. Sofort wird die Heizung entfernt und die Lösung langsam abgekühlt. Der Erfolg der Abspaltung muß dünn-schichtchromatographisch kontrolliert werden, da zu kurzes Erhitzen nur partiellen Umsatz zur Folge hat, zu langes Erhitzen jedoch zahlreiche Nebenprodukte erzeugt. Das Rohprodukt wird weitgehend von Lösungsmitteln befreit und mit tert-Butylmethylether und demin. Wasser versetzt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und mit tert-Butylmethylether gereinigt. Auf eine Isolierung des hydrophilen Spacers kann verzichtet werden, wenn er im wässrigen Milieu weiter umgesetzt werden soll.

### 6.23 Synthese von i-Pr/Cl/EDA-DGS

Die wässrige Phase aus der Spacer-Synthese (EDA-DGS, 6.22) wird mit konzentrierter Natriumhydrogencarbonat-Lösung alkalisch gemacht. 7.1 g i-Pr/Cl/Cl werden in 50 mL tert-Butylmethylether gelöst und unter starkem Rühren mit der wässrigen Phase gemischt. Nach 24 Stunden Reaktionszeit bei Raumtemperatur werden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird zweimal mit tert-Butylmethylether gewaschen und anschließend mit verdünnter Salzsäure vorsichtig angesäuert. Der pH soll ca. bei 3-4 liegen. Dann wird mehrfach ausgeethert. Die Extrakte werden vereinigt und vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute i-Pr/Cl/EDA-DGS ( $M_r$  434.9): 1.8 g (ca. 30 %), Fp. 1. Frakt. 132-134 °C, DC (VI)  $R_f=0.87$ , DC (VII)  $R_f=0.69$ , FAB-MS (Matrix: G/TG):  $m/z=435$  ( $M^+ + H$ ).

### 6.24 Synthese von i-Pr/Cl/Cl

20 g (108 mmol) Cyanurchlorid werden in 300 mL tert-Butylmethylether gelöst und filtriert. Bei -10 °C werden unter starkem Rühren 17.2 mL (200 mmol) Isopropylamin langsam zugetropft. Nach 15 Minuten wird die Suspension bei ca. 10 °C filtriert. Die Lösung kann entweder gleich weiterverarbeitet werden oder am Rotationsverdampfer einrotiert werden. Unter Luftabschluß ist dieses reaktive Zwischenprodukt auch bei Raumtemperatur lange haltbar.

Ausbeute i-Pr/Cl/Cl ( $M_r$  207.1): 1. Frakt. 12.3 g (55.0 %), Fp. 40.5-42 °C, DC (I)  $R_f=0.73$ , DC (II)  $R_f=0.72$ .

### 6.25 Tracersynthese A

10 mg t-Bu/Cl/C6 bzw. Haptencarbonsäure (32  $\mu\text{mol}$ ) werden in 500  $\mu\text{L}$  trockenem Glyme gelöst. Dann werden 20 mg Natriumsulfat und 3.7 mg (32  $\mu\text{mol}$ ) NHS zugegeben. Die Lösung wird auf ca. 0 °C abgekühlt. Nach der Zugabe von 10 mg (52  $\mu\text{mol}$ ) EDC wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. 1.2 mg Peroxidase werden in 500  $\mu\text{L}$  0.1 M Boraxpuffer gelöst. In Abständen von 30 min werden 3mal 20  $\mu\text{l}$  NHS-Ester-Lösung unter Rühren zugegeben. Die Reaktionsdauer beträgt ca. 2 Stunden. Enzymlösungen, die nicht völlig klar erscheinen, sollten vor der gelchromatographischen Reinigung zentrifugiert werden (z.B. 30 min bei 17.000 U/min ( $> 25.000$  g)). Dann wird eine Sephadex PD-10 Entsalzungssäule mit Phosphatpuffer (PBS) äquilibriert und die Peroxidase-Lösung aufgetragen. Da die Peroxidase-Bande durch ihre starke Eigenfärbung gut sichtbar ist, kann sich die Fraktionierung auf die gefärbten Anteile beschränken. Als manuelle Fraktionensammler haben sich Mikrotiterplatten aus Polystyrol bewährt. Sie erlauben es zusätzlich, durch eine Messung bei 405 nm die relative Konzentration der Peroxidase abzuschätzen. Die gepoolten Fraktionen können ohne jede weitere Reinigung in Eppendorf-Caps™ bei 4 °C lange Zeit (mindestens 1 Jahr) aufbewahrt werden.

### 6.26 Tracersynthese B

20 mg (66  $\mu\text{mol}$ ) i-Pr/Cl/C6 werden mit 100 mg Natriumsulfat (oder Molekularsieb) versetzt und in 500  $\mu\text{L}$  DMSO (Molsieb-getrocknet) gelöst. Die Mischung wird abgekühlt (0 °C) und 5.3  $\mu\text{L}$  (66  $\mu\text{mol}$ ) Pyridin sowie anschließend 18.7 mg (73  $\mu\text{mol}$ ) DSC werden zugefügt. Nach 1 Stunde Reaktionszeit bei Raumtemperatur kann die Enzymkopplung durchgeführt werden: 2 mg ( $4.55 \cdot 10^{-8}$  mol) Peroxidase werden in 500  $\mu\text{L}$  0.2 M Natriumhydrogencarbonatpuffer gelöst. 6.5  $\mu\text{L}$  (ca. 90 mol/mol Peroxidase) NHS-Ester-Lösung werden in 10 Minuten-Abständen zupipettiert. Die Reaktion wird über Nacht bei 4 °C weitergeführt. Nach einem eventuellen Zentrifugationsschritt wird der Peroxidase-Tracer auf einer 20 cm langen Säule mit Fractogel HW-40 (F) gelchromatographisch gereinigt. Die Säule wird mit PBS äquili-

briert. Die Trennung kann auch mit einer Sephadex PD-10 Säule erfolgen. Alle weiteren Schritte siehe Tracersynthese A.

### 6.27 Tracersynthese C

200 mg (0.535 mmol) Cl/C6/C6, 200 mg (1.74 mmol) NHS und 150 mg (0.59 mmol) DSC werden in 2 mL trockenem DMSO gelöst. Dann werden 400 mg (2.1 mmol) EDC zugefügt. Nach 20 Stunden Rühren bei Raumtemperatur werden zu einer Lösung aus 3 mg ( $6.8 \cdot 10^{-8}$  mol) Peroxidase und 1 mL Boraxpuffer (0.1 M) 10  $\mu$ L der Esterlösung gegeben. 24 Stunden später kann der Tracer mit einer Sephadex PD-10-Säule gelchromatographisch gereinigt werden.

### 6.28 Tracersynthese D

16.2 mg (0.05 mmol) t-Bu/Et/C6 und 11.5 mg (0.1 mmol) NHS werden in 1000  $\mu$ L trockenem Glyme gelöst. In Abständen von 10 min werden dreimal 10 mg ( $\Sigma$  0.12 mmol) DSC zugesetzt. Spätestens bei der letzten DSC-Zugabe sollten keine Gasblasen mehr entstehen. Nach 1 Stunde werden 38.4 mg (0.2 mmol) EDC hinzugefügt. Die Mischung wird mindestens 2 Stunden, besser über Nacht gerührt. 5 mg Peroxidase werden in 500  $\mu$ L Boraxpuffer (0.1 M) gelöst. Im Abstand von 20 min werden zweimal 57  $\mu$ L Esterlösung unter Rühren hinzugefügt. Diese Menge entspricht etwa einem 50fachen molaren Überschuss relativ zur Enzymmenge. Der Tracer wird für 12 Stunden bei 4 °C gelagert, zentrifugiert und mit einer Sephadex PD-10-Säule gelchromatographisch gereinigt. Für die Äquilibrierung und die Chromatographie wird PBS verwendet.

### 6.29 Dichlorprop-Tracer

10 mg (43  $\mu$ mol) Dichlorprop und 5 mg (43  $\mu$ mol) NHS werden in 300  $\mu$ L trockenem Glyme gelöst. Der Lösung wird ein Kügelchen Molekularsieb hinzugefügt. Bei 0 °C werden 9 mg (47  $\mu$ mol) EDC zugegeben. Die Mischung wird 1 Stunde bei 0 °C und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. 2 mg ( $4.5 \cdot 10^{-8}$  mol) Peroxidase werden in 300  $\mu$ L 0.2 M Natriumhydrogencarbonatpuffer gelöst. Dann werden bei Raumtemperatur 45  $\mu$ L NHS-Ester-Lösung (in 9 Portionen à 5  $\mu$ L) zupipettiert. Eine Stunde nach der letzten Zugabe wird der Tracer auf einer Fractogel HW-40 (F)-Säule gelchromatographisch gereinigt.



### 6.30 Pyren-Tracer

20 mg (70  $\mu\text{mol}$ ) Pyrenbuttersäure werden in 1000  $\mu\text{L}$  trockenem DMSO gelöst. 11.5 mg (0.1 mmol) NHS und 20 mg (78  $\mu\text{mol}$ ) DSC werden unter Rühren zugegeben. Nach 15 Minuten werden 50 mg (0.26 mmol) EDC hinzugefügt. Nach 3 Stunden werden 50  $\mu\text{L}$  Esterlösung zu 2 mg Peroxidase in 500  $\mu\text{L}$  Boraxpuffer (0.1 M) gegeben. Nach 2 Stunden wird der Tracer gelchromatographisch (Sephadex PD-10) gereinigt.

### 6.31 Desalkyltracer (H/Cl/C6)

50 mg (0.19 mmol) H/Cl/C6 werden in 1000  $\mu\text{L}$  Glyme gelöst. Dann werden 30 mg (0.26 mmol) NHS und 20 mg (78  $\mu\text{mol}$ ) DSC hinzugefügt und 30 Minuten gerührt. Anschließend gibt man 50 mg (0.26 mmol) EDC zu und läßt bei Raumtemperatur mehrere Stunden reagieren. 5 mg Peroxidase werden in 500  $\mu\text{L}$  Borax/HCl-Puffer (pH 8.5) gelöst. Anschließend werden zweimal 50  $\mu\text{L}$  Esterlösung unter starkem Rühren zupipettiert. Nach 3 Stunden Reaktionszeit kann der Tracer mit einer Sephadex PD-10-Säule gelchromatographisch gereinigt werden.

### 6.32 "Monotracer" (t-Bu/Et/C6)

6.5 mg ( $2.0 \cdot 10^{-5}$  mol) t-Bu/Et/C6 und 45.2 mg ( $2.0 \cdot 10^{-4}$  mol) 2,4-Dinitrophenyllessigsäure (umkrist.) werden in 100  $\mu\text{L}$  DMSO vorgelöst und mit 400  $\mu\text{L}$  Glyme verdünnt. Dann werden 25.3 mg (0.22 mmol) NHS und 56.4 mg (0.22 mmol) DSC zugesetzt. Nach 30 Minuten gibt man 69.0 mg (0.36 mmol) EDC hinzu. Nach 24 Stunden wird die Lösung mit 2 mL DMSO aufgefüllt. 4.7 mg ( $1.07 \cdot 10^{-7}$  mol) Peroxidase werden in 500  $\mu\text{L}$  Boraxpuffer (pH 8.5, 0.1 M) gelöst und mit dreimal 20  $\mu\text{L}$  Esterlösung versetzt. Die trübe Lösung wird nach 24 Stunden bei 17000 U/min zentrifugiert und gelchromatographisch (Sephadex PD-10) gereinigt.

### 6.33 Hydrazidtracer (t-Bu/Et/C6)

200  $\mu\text{L}$  Peroxidase-Tracer (t-Bu/Et/C6) werden bei Raumtemperatur mit 100  $\mu\text{L}$  Natriumperiodatlösung (0.1 M) versetzt. Nach 30 min wird die Reaktion durch Gelchromatographie mit einer Sephadex PD-10 Säule unterbrochen. Dann werden 100  $\mu\text{L}$  einer 0.5 M Glutarsäuredihydrazid-Lösung hinzugegeben. Nach 90 Minuten wird nochmals über eine PD-10-Säule gereinigt.

### 6.34 Multihapten-Immunogen (BSA)

Je 0.1 mmol i-Pr/OH/C6, t-Bu/OH/C6, t-Bu/Cl/C6, H/Cl/C6, i-Pr/Cl/C11, i-Pr/Et/3MPS, t-Bu/Et/3MPS, i-Pr/Cl/C3, i-Pr/SMe/C6, Et/Cl/C6 werden in 3 mL DMSO gelöst. 115.1 mg (1.0 mmol) NHS werden hinzugefügt. Dann werden 75 mg DSC (0.29 mmol) in drei Portionen zugegeben. Gasblasen zeigen das Vorhandensein von Wasser im Lösungsmittel: Es muß so viel DSC zugegeben werden, bis kein Aufschäumen mehr erfolgt. Nachdem die Mischung von Wasserspuren befreit wurde, gibt man 210.9 mg (1.1 mmol) EDC zu und rührt bei Raumtemperatur über Nacht. 200.6 mg BSA (Boehringer, Fraktion V) werden in 4.012 mL Natriumhydrogencarbonatpuffer (0.1 M) gelöst. Die Esterlösung wird 1:1 mit DMSO verdünnt und davon werden 350 µL unter Rühren sehr langsam zur BSA-Lösung pipettiert. Nach 24 Stunden wird die Reaktionsmischung bei 17000 U/min zentrifugiert und der Überstand mit dem doppelten Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und mit Phosphatpuffer wieder aufgelöst. Diese Fällung wird einmal wiederholt. Die Kopplungsdichte kann durch eine Amingruppenbestimmung mittels Ninhydrin abgeschätzt werden [463][464]. Als Referenz wurde BSA und Glutarsäureanhydrid-derivatisiertes BSA verwendet. Der Testansatz besteht aus 2 mL PBS, 60 µL BSA-Lösung und 20 µL Ninhydrin-Stammlösung (100 mg in 1 mL DMSO). Die Testmischung wird für einige Minuten auf 90 °C erhitzt, zentrifugiert und bei 600 nm vermessen. Alternativ kommt die Bestimmung der Amingruppen mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure in Frage [465], wobei jedoch die stark allergene Wirkung dieses Reagenzes beachtet werden muß.

Kopplungsdichte: 74 % (22-26 Reste pro BSA-Molekül, maximal möglich: 30-35 (59 Lysin-Reste).

### 6.35 Multihapten-Immunogen (Hämocyanin)

Die Herstellung der Ester-Mischung erfolgt wie oben beschrieben. 230 mg Hämocyanin ( $M_r$  ca. 9 Mio) von *Helix pomatia* (HPH) werden mit 5 mL PBS rekonstituiert. Nach 3 Stunden wird das Ungelöste bei 17000 U/min (30 min, 10 °C) abzentrifugiert. 500 µL Überstand werden mit 4.5 mL Natriumhydrogencarbonat-Puffer (0.1 M) versetzt. Dann werden 400 µL der 1:3 mit DMSO verdünnten Esterlösung zugegeben. Die Reinigung erfolgt analog zum BSA-Konjugat. Eine Kopplungsdichte im engeren Sinn kann nicht angegeben werden, da die Molmasse von Hämocyanin-Präparaten schlecht definiert ist. Eine weitergehende Reinigung kann mit Dialyse oder Gelchromatographie durchgeführt werden.

Anmerkung: KLH (keyhole limpet hemocyanin) wird als Carrier häufig eingesetzt. Es wurden nach der o.g. Methode nur weitgehend unlösliche Konjugate erhalten. Hämocyanin von *Helix pomatia* (Weinbergschnecke) scheint bessere Löslichkeitseigenschaften aufzuweisen, ist preiswerter und in reinerer Form erhältlich.

### 6.36 Multihapten-Tracer ("MIX10")

5.0 mg ( $1.1 \cdot 10^{-7}$  mol) Peroxidase werden in 500  $\mu$ L Boraxpuffer (pH 8.5, 0.1 M) gelöst und mit dreimal 20  $\mu$ L Esterlösung (aus dem Ansatz "Multihapten-Immunogen") versetzt. Die trübe Lösung wird nach 12 Stunden (4 °C) bei 17000 U/min zentrifugiert und gelchromatographisch (Sephadex PD-10) gereinigt.

### 6.37 Herstellung einer Peroxidase-Affinitätsmatrix

500 mg Polymerträger VA-Epoxy (Riedel-de Haën) [466] wird mit 2 mL PBS aufgeschlämmt. 6.5 mg Peroxidase werden in 3 mL PBS gelöst und mit der Polymersuspension vermischt. Die Mischung wird 24 Stunden kräftig geschüttelt. Dann wird bei 17000 U/min zentrifugiert und mindestens 10mal mit PBS gewaschen. Überschüssige Epoxygruppen können mit einer Lösung aus  $\beta$ -Alanin oder Lysin blockiert werden. Es muß so lange gewaschen werden, bis der Überstand keine nennenswerte Peroxidaseaktivität mehr aufweist.

### 6.38 Triazincarbonsäure-Methylester

20 mg (62  $\mu$ mol) t-Bu/Et/C6 werden in 1000  $\mu$ L Methanol gelöst. Dann werden 12  $\mu$ L (130  $\mu$ mol) POCl<sub>3</sub> unter Rühren zugegeben. Nach 1 Stunde werden 200 mg Natriumhydrogencarbonat hinzugefügt und die Mischung geschüttelt oder gerührt. Nach einer weiteren Stunde wird der Verlauf der Reaktion dünnenschichtchromatographisch (Silicagel, Laufmittel: MTBE/Ethylacetat 1:1) kontrolliert.

## 7 Dünnschichtchromatographie

### 7.1 Methode DC (I)

Als stationäre Phase wurden DC-Platten von Macherey-Nagel, Düren des Typs Polygram SIL G/UV<sub>254</sub> (Format 40 x 80 mm) verwendet. Diese Platten reichen für die meisten Zwecke aus. Für besonders kritische Trennungen verwende man den Typ Nano-Platten SIL-20 UV<sub>254</sub> (Format 50 x 50 mm). Beide Plattentypen basieren auf Kieselgel mit Fluoreszenzindikator. Die Platten werden mit MTBE (+ 2 % Eisessig) vorbehandelt und bei RT getrocknet. Die Analyten werden vorteilhaft in Glyme gelöst und mit Glaskapillaren aufgetragen. Sollte die Löslichkeit in Glyme nicht hoch genug sein, so muß man auf DMSO ausweichen. Dieses Lösungsmittel hat jedoch den Nachteil der sehr geringen Flüchtigkeit. Man muß DMSO mittels eines Stickstoffstroms von der Platte möglichst restlos entfernen, was je nach Temperatur und Plattentyp über 2 Stunden dauern kann. Als Laufmittel wird ein Gemisch aus 83 Vol% Toluol, 15 Vol% Dioxan und 2 Vol% Eisessig verwendet. Die Detektion der Banden erfolgt unter der UV-Lampe. Färbereagenzien sind in der Regel nicht erforderlich.

## **7.2 Methode DC (II)**

Diese Methode wird mit Erfolg bei der Trennung von Triazin-Herbiziden angewandt. Die Stärke dieses Laufmittels liegt insbesondere darin, auch ähnliche Alkyltriazine noch zu trennen. Die Platte wird mit Laufmittel vorgewaschen und bei RT getrocknet. Das Laufmittel besteht aus dem bewährten Gemisch Toluol/Aceton (85/15 Vol%). Auch Varianten mit Toluol/Aceton (50/50 Vol%) sowie mit sauren Zusätzen Toluol/Aceton/Ameisensäure (49/49/2 Vol%) sind nützlich. Alle weiteren Angaben siehe DC (I).

## **7.3 Methode DC (III)**

Die Platte wird mit Laufmittel vorgewaschen und bei RT getrocknet. Das Laufmittel besteht aus Hexan/Ethylacetat (50/50 Vol%). Alle weiteren Angaben siehe DC (I).

## **7.4 Methode DC (IV)**

Die Platte wird mit Laufmittel vorgewaschen und bei RT getrocknet. Das Laufmittel besteht aus Hexan/Ethylacetat/Ameisensäure (50/45/5 Vol%). Alle weiteren Angaben siehe DC (I).

## **7.5 Methode DC (V)**

Diese Methode wurde insbesondere für die Trennung von Carbonsäuren und NHS-Estern entwickelt und ist zur Kontrolle der Aktivierung vor der Proteinkopplung vorgesehen. Die Platte wird mit Laufmittel vorgewaschen und bei RT getrocknet. Das Laufmittel besteht aus MTBE/EtOH/Ameisensäure (90/9/1 Vol%). Alle weiteren Angaben siehe DC (I).

## **7.6 Methode DC (VI)**

Diese Methode ist für die Trennung von hydrophilen Carbonsäuren geeignet. Das Laufmittel ist untypischerweise wässrig, obwohl keine RP-Platte benutzt wird. Es besteht aus dem Gemisch Wasser/MeOH/MTBE/Glycol/Eisessig (66/16/8/8/2 Vol%). Alle weiteren Angaben siehe DC (I).

### 7.7 Methode DC (VII)

Diese Methode stellt eine Variante von DC (VI) dar und ist gleichfalls für die Trennung von hydrophilen Carbonsäuren geeignet. Das Laufmittel ist hier nicht wässrig, was eine Umkehrung der Reihenfolge der  $R_f$ -Werte zur Folge hat. Es wird ein Gemisch aus MeOH/MTBE/Glycol (50/25/25 Vol%) benutzt. Alle weiteren Angaben siehe DC (I).

### 7.8 Methode DC (VIII)

DC (VIII) arbeitet mit basischen Lösungsmitteln und ist in erster Linie für die Auftrennung von Aminen vorgesehen. Es wird ein Gemisch aus EtOH/Wasser/Ammoniak(25%ig) (80/10/10 Vol%) benutzt. Eine Vorbehandlung der Platte mit dem Laufmittel verbessert die Trennung. Die Detektion kann bei primären Aminen vorteilhaft durch Besprühen mit alkoholischer Ninhydrin-Lösung und anschließendem vorsichtigen Erwärmen geschehen. Alle weiteren Angaben siehe DC (I).



## VIII. ABKÜRZUNGEN

## 1 Triazin-Kurznamenklatur

Da die meisten verwendeten Derivate keine Trivialnamen besitzen und die Nomenklatur nach IUPAC, CA usw. zu sperrig und unübersichtlich erscheint, wird hier eine Kurznamenklatur eingeführt. Sie basiert auf dem symmetrischen 1,3,5-Triazin-Ring, der an den Positionen 2, 4 und 6 Substituenten tragen kann. Sind die Substituenten einfache Alkylamine, so wird nur deren Alkylrest-Kurzform angegeben (z.B. i-Pr); dies gilt auch für NH<sub>2</sub> das mit H abgekürzt wird. Chlor wird als Cl, Hydroxy als OH und Thiomethyl als SMe angegeben. Etwas heterogener ist die Bezeichnung der Spacer, bei denen C11 11-Aminoundecansäure, C6 6-Aminohexansäure, C3 3-Aminopropansäure, C2 2-Aminoethansäure (Glycin), 3MPS 3-Mercaptopropansäure, 1,3DAP 1,3-Diaminopropan, 1,8DAO 1,8-Diaminooctan, EDA 2,2'(Ethylendioxy)diethylamin und DGS Diglycolsäure bedeuten. Eine Aneinanderreihung der Spacernamen soll als Verbindung der Spacer über eine Amidbindung verstanden werden. Diese Bezeichnungen werden sowohl für die Triazinderivate als solche verwendet, als auch für die aus einer Kopplung hervorgegangenen Hapten-Konjugate. Letztere besitzen statt einer freien Carboxylgruppe eine Amidbindung zu einem Lysin-Rest des betreffenden Proteins.

## Beispiele:

i-Pr/Cl/Et	2-Chlor-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazin
Et/Cl/Et	2-Chlor-4,6-bis(ethylamino)-s-triazin
i-Pr/Cl/C6	2-Chlor-4-(isopropylamino)-6-[(1-carboxypent-5-yl)amino]-s-triazin
t-Bu/Et/C6	2-( <i>tert</i> -Butylamino)-4-(ethylamino)-6-[(carboxypent-5-yl)amino]-s-triazin
i-Pr/SMe/C6	2-(Isopropylamino)-4-(methylthio)-6-[(1-carboxypent-5-yl)amino]-s-triazin
i-Pr/Et/MPS	2-(Ethylamino)-4-(isopropylamino)-6-[(1-carboxyeth-2-yl)thio]-s-triazin
H/Cl/C11	2-Chlor-4-amino-6-[(1-carboxydec-10-yl)amino]-s-triazin
i-Pr/OH/C6	2-Hydroxy-4-(isopropylamino)-6-[(1-carboxypent-5-yl)amino]-s-triazin
i-Pr/Et/1,3DAP	2-Ethyl-4-(isopropylamino)-6-[(1-aminoprop-3-yl)amino]-s-triazin
i-Pr/Cl/EDA-DGS	2-Chlor-4-(isopropylamino)-6-[(5-aza-2,8,11-trioxa-4-oxo-1-carboxytridec-13-yl)amino]-s-triazin

## Beispiele unterschiedlicher Nomenklatur:

Atrazin (Trivialname), Gesaprim (Handelsname)  
 6-Chlor-N<sup>2</sup>-ethyl-N<sup>4</sup>-isopropyl-1,3,5-triazin-2,4-diamin (IUPAC)  
 6-Chlor-N-ethyl-N'-(1-methylethyl)-1,3,5-triazin-2,4-diamin (CA)  
 2-Chlor-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazin (CA)  
 CAS Registry Number [1912-24-9]

## 2 Alphabetische Liste der Abkürzungen

A	Parameter der 4-parametrischen Gleichung (obere Tangente, max. Absorption)
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ACE	Acetylcholinesterase (aus Zitteraal)
Aminotriazol	3-Amino-1,2,4-triazol
AMPPD	3-[2'-Spiroadamantan-4-methoxy-4-(3"-phosphoryloxy)-phenyl]-1,2-dioxetan
AP	Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)
ATR	Attenuated Total Reflection
AVI	Avidin (Biotin-bindendes Protein, aus Hühnerei)
B	Parameter der 4-parametrischen Gleichung (Steigungsfaktor)
B <sub>0</sub>	Absorption des Nullstandards (entspricht sinngemäß dem Parameter A)
B/B <sub>0</sub>	Auf den Nullstandard normierte Absorption (B ist hier nicht der Steigungsfaktor)
BAY R 1005	N-(2-Desoxy-2-L-leucylamino-β-D-glucoopyranosyl)-N-octadecyl-dodecansäureamid
BSA	Rinderserumalbumin
C	Parameter der 4-parametrischen Gleichung (Testmittelpunkt, 50%-Wert, IC <sub>50</sub> )
C2	2-Aminoethansäure (Glycin)
C3	3-Aminopropansäure (β-Alanin)
C6	6-Aminohexansäure
C11	11-Aminoundecansäure
CBG	Corticosteroid Binding Globulin (Transcortin)
cFA	Komplettes Freundsches Adjuvans
Chlorazin	2-Chlor-4,6-bis-(diethylamino)-s-triazin
CMC	Carboxymethylcellulose
COR	Chick Oviduct Receptor A
c-Pr	Cyclo-Propyl
CR	Cross Reactivity (Kreuzreaktion)
D	Parameter der 4-parametrischen Gleichung (untere Tangente, "unspezifische" Bindung)
1,8DAO	1,8-Diaminooctan
1,3DAP	1,3-Diaminopropan
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
Demin.	Demineralisiertes (entsalztes) Wasser
DGS	Diglycolsäure
DHNDS-NP	4,5-Dihydroxy-3(4-nitrophenylazo)-2,7-naphthalindisulfonsäure
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
2,4-DNP	2,4-Dinitrophenyl-
DSC	Di-(N-succinimidyl)-carbonat
EDA	2,2'-(Ethylendioxy)diethylamin
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EIA	Enzymimmunoassay (Immunoassay mit Enzym als Label)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (EIA auf Festphasen)
Et	Ethyl
F <sub>ab</sub>	Fragment, antigen-binding; Monovalenter Teil eines Antikörpers
FAB-MS	Fast Atom Bombardment, spezielle Ionisationsmethode der Massenspektrometrie
GC	Gaschromatographie
GC-MSD	Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor (= Quadrupol-Massenspektrometer)



GC-NPD	Gaschromatographie mit stickstoff/phosphorselektivem Detektor
GG	Gleichgewicht
GMDP	N-Acetyl-D-glucosaminyl-( $\beta$ 1-4)-N-acetyl-muramyl-alanyl-D-isoglutamin, Glycopin
G/TG	Glycerin/Thioglycerin-Gemisch 3:1 (Matrix für FAB-MS)
Glyme	1,2-Dimethoxyethan
Häm	Hämin, Ferriprotoporphyrin-IX-chlorid
HCG	Choriongonadotropin (human chorionic gonadotropine)
HPA	4-Hydroxyphenyllessigsäure
HPH	Helix pomatia Hemocyanin (Hämocyanin einer Schnecke)
HPLC	High-performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPPA	4-Hydroxyphenylpropionsäure
HPTLC	High-performance thin-layer chromatography (Hochleistungsdünnschichtchromatographie)
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IA	Immunoassay
iFA	Inkomplettes Freundsches Adjuvans
IgG	Immunglobulin G (bivalenter Antikörper), weitere Klassen: IgM, IgA, IgE, IgD
i-Pr	Isopropyl
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin (Hämocyanin einer Schnecke)
Mab	Monoclonal Antibody
mAK	Monoklonaler Antikörper
MCPBA	3-Chlorperbenzoesäure
MCPA	(4-Chlor-2-methylphenoxy)essigsäure
MDT	2-Methylmercapto-4,6-dichlor-s-triazin
Me	Methyl
Merthiolat	Handelsname für Thimerosal (Ethylquecksilberthiosalicylat, Na-Salz)
3MPS	3-Mercaptopropionsäure
$M_r$	Relative Molekülmasse
MTBE	tert-Butyl-Methyl-Ether
MTP	Mikrotiterplatte, Mikrotitrationsplatte (Polystyrolplatte mit 96 Kavitäten)
MUG	4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
MUP	4-Methylumbelliferylphosphat
n	Anzahl der Replikate
NBA	3-Nitrobenzylalkohol (Matrix für FAB-MS), hier: gesättigt mit NaCl
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NHS-Ester	Siehe NHS; ein kopplungsfähiger, aktivierter Ester
NPP	4-Nitrophenylphosphat
n-Pr	Propyl
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbons, Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, z.B. Pyren
pAK	Polyklonaler Antikörper (Serum)
Pam <sub>3</sub> Cys	S-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-cystein
Pam <sub>3</sub> Cys-Ser	S-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-cystein-(S)-serin
PBG	Progesterone Binding Globuline
PBS	Phosphatpuffer (pH 7.6) mit NaCl-Zusatz (phosphate-buffered saline)
PEG 20.000	Polyethylenglycol mit einer mittleren Molmasse von 20.000
POD	Peroxidase, meist im Sinne von Meerrettichperoxidase
i-Pr/Cl/Et	Atrazin (siehe Kurznomenklatur)
$R_f$	("relate to front"), Wert zur Charakterisierung des Laufverhaltens einer Substanz auf einer Dünnschichtplatte [467], $0 \leq R_f \leq 1$ .
RIA	Radioimmunoassay (Immunoassay mit radioaktivem Tracer)

---

RLR	Rat Liver Receptor
RP	Reversed Phase: Silicagel, das durch Silylierung unpolar gemacht wurde.
RT	Raumtemperatur (ca. 25°C)
RTime	Retentionszeit (unkorrigiert)
RZ	Reinheitszahl, charakterisiert Peroxidase-Präparationen, $RZ = A_{403}/A_{275}$
s	Standardabweichung
SAVI	Streptavidin (Biotin-bindendes Protein, Quelle: mikrobiell)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SFE	Supercritical Fluid Extraction
SPE	Solid Phase Extraction
SPR	Surface Plasmon Resonance
2,4,5-T	2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
t-Bu	<i>tert</i> -Butyl
Thimerosal	Handelsname: Merthiolat (Ethylquecksilber-thiosalicylat, Na-Salz)
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNT	Trinitrotoluol (Sprengstoff)
Trityl-Rest	Triphenylmethyl-Rest

### 3 Verzeichnis der Tabellen

- Tabelle 1: Daten zur Meerrettich-Peroxidase.
- Tabelle 2: Vergleich verschiedener Marker.
- Tabelle 3: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Terbutylazin (Peaks von 7-8 ppm).
- Tabelle 4: Vergleich der bisher publizierten Triazin-Immunoassays.
- Tabelle 5: Beispiele für Affinitätskonstanten von monoklonalen Antikörpern.
- Tabelle 6: Bestimmung der Gleichgewichtskonstante - Vergleich der Verfahren.
- Tabelle 7: Kinetische und thermodynamische Daten von Protein/Hapten-Reaktionen.
- Tabelle 8: Antikörper für die Spacer-Recognition-Untersuchungen.
- Tabelle 9: Weitere Antikörper für die Spacer-Recognition-Untersuchungen.
- Tabelle 10: Kreuzreaktionen (C193) bei unterschiedlichen Tracerinkubationszeiten.
- Tabelle 11: Simulierte Kreuzreaktionen (I).
- Tabelle 12: Simulierte Kreuzreaktionen (II).
- Tabelle 13: Simulierte Kreuzreaktionen (III).
- Tabelle 14: "Klon-Statistik".
- Tabelle 15: Kreuzreaktionen des mAK NMI 118.
- Tabelle 16: Kreuzreaktionen des mAK NMI 54.
- Tabelle 17: Kreuzreaktionen des mAK NMI 21.
- Tabelle 18: Kreuzreaktionen des mAK NMI 71.
- Tabelle 19: Peroxidase-Tracer (Charakterisierung).
- Tabelle 20: Stabilisierung von Peroxidase-Tracern (I).
- Tabelle 21: Stabilisierung von Peroxidase-Tracern (II).
- Tabelle 22: Konservierung von Peroxidase-Tracern.
- Tabelle 23: Vergleich der Dimensionen von Tetramethylbenzidin und Cyclodextrinen.

## IX. GLOSSAR

Affinitätskonstante	Thermodynamische Konstante $K =$ Gleichgewichtskonstante Hier: Scheinbare Affinitätskonstante
Anti-	Bezeichnet Antikörper gegen einen Stoff, z.B. anti-Pyren-Antikörper; Der Zusatz anti- wird in dieser Arbeit oft weggelassen, um die Namen nicht zu unübersichtlich zu machen: Pyren-Antikörper = anti-Pyren-Antikörper
Antigen	Hochmolekularer Stoff, der sowohl eine Immunantwort auslösen, als auch von Antikörpern gebunden werden kann
Antigenprocessing	"Bearbeitung" eines Antigens zum Einschleusen in das Immunsystem
Antikörper	Protein, das Bindungsstellen für andere Stoffe besitzt (siehe Einführung)
Assoziationskonstante	Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion (Komplexbildung) [Einheit], Hier: Scheinbare Assoziationskonstante (nicht: Gleichgewichtskonstante)
Bindungskonstante	Identisch mit Gleichgewichtskonstante $K$
Blocking	Behandlung mit Blocking-Reagenzien, z.B. BSA. Dient zum Abdecken (re-)aktiver Stellen auf einer Oberfläche.
Bridge Binding	Siehe Bridge Recognition
Bridge Recognition	Bevorzugte Bindung von Spacerderivaten durch Antikörper, die mittels ähnlichen Derivaten gewonnen wurden
Brückenantikörper	Das Auftreten von sog. Brückenantikörpern wird angenommen, wenn der Tracer gut, der Analyt aber nur schlecht gebunden wird (siehe Spacer u. Bridge Recognition)
Cap	Mikroreaktionsgefäß aus Kunststoff mit Deckel (ca. 0.5 bis 2.5 mL)
Carrier	Trägermaterial, hier auch: Trägerprotein zur Herstellung von Haptenkonjugaten
Chromogenes Substrat	Substrat, das durch die enzymatische Reaktion zu einem Farbstoff umgesetzt wird
Clean-up	Vorreinigung einer Probe, manchmal gleichzeitig mit einer Anreicherung
Coating	Beschichtung von Oberflächen mit Reagenzien (z.B. mit Antikörpern o.a. Proteinen)
Counter	Hier: Gerät zur Quantifizierung von radioaktiver Strahlung
Dissoziationskonstante	Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion (Komplexzerfall) [1/s], (nicht: $1/K$ , Kehrwert der Gleichgewichtskonstante)
Doppelantikörpertechnik	Antikörperimmobilisierung über anti-IgG-Antikörper (Vorcoaten)
Eichkurve	Kalibrationskurve, nicht: Eichung im Sinne des Eichgesetzes
Eichlösung	Standard-Lösung, Kalibrationslösung, nicht: Eichung im Sinne des Eichgesetzes
Empfindlichkeit	Nachweisgrenze bzw. Testmittelpunkt, nicht: Steigung
Endotoxine	Lipopolysaccharide (Polysaccharid kovalent an Lipid A gebunden)
Entwicklung	Hier: Messung der Enzymaktivität mit Hilfe eines chromogenen Substrates
Fehlerbalken	Entsprechen der Spannweite, sofern nichts anderes angegeben ist; Spannweite $\approx 2s$
First-come, first-served	Wer zuerst kommt, mahlt zuerst, hier: Effekt, der Verlust von Selektivität durch Kurzinkubation beschreibt
Fitting	Anpassung von Parametern einer Gleichung an Meßdaten
Gleichgewichtskonstante	Thermodynamische Konstante $K =$ Affinitätskonstante [L/mol] Hier: Scheinbare Gleichgewichtskonstante
Halbwertszeit	$\ln 2 /$ Dissoziationskonstante [s]
Hapten	Kleines Molekül, das zwar von einem Antikörper gebunden werden, aber allein keine Immunantwort auslösen kann
Heterogener IA	Mindestens eine Komponente ist immobilisiert
Heterologer IA	Immunogen und Tracer haben unterschiedliche Hapten-Strukturen
Homogener IA	Alle Komponenten befinden sich in Lösung
Homologer IA	Immunogen und Tracer haben gleiche Hapten-Strukturen
Inhibition	Hier: Meist im Sinne von Verminderung der Tracerbindung (Kompetition)
Inkubationszeit	Reaktionszeit

Kavität	Einzelnes Mikrogefäß einer Mikrotiterplatte, maximal ca. 350 $\mu\text{L}$ Inhalt
Konjugat	Durch kovalente Kopplung erhaltene Verbindung aus mindestens zwei Teilen
Kreuzreaktion	Relative Empfindlichkeit der Detektion einer Substanz
Label	Markierung (z.B. radioaktives Isotop, Fluoreszenzfarbstoff, Enzym)
Ligand	Allgemeine Bezeichnung für kleines Molekül, das von großem gebunden wird Spezialfall: Hapten (Bindungsmolekül ist ein Antikörper)
Lyophilisierung	Gefriertrocknung
Nachweisgrenze	Konzentration, die Nullwert - 3s entspricht
Nullprobe	Probe, die keinen Analyten enthält (entspricht "blank")
Mikrotiterplatte	Eigentlich: Mikrotitrationsplatte, 8·12-Anordnung von 96 Mikrogefäßen (Polystyrol)
Monovalent	Einbindig
Multivalent	Mehrbindig
Pattern	Muster, hier im Sinne von: Charakteristische Eigenschaften bzw. Bindungsprofil
Performance	Leistung, hier auch im Sinne von Qualitätscharakteristik
Pseudohomogener IA	Antikörper reagiert in homogener Lösung mit Analyt und Tracer. Trennung erfolgt jedoch an fester Phase mit einer Doppelantikörpertechnik
Pyrogen	Fiebererzeugend
Ranking	Eine Rangfolge festlegen, in eine Reihenfolge bringen
Randeffekt	Empirischer Befund, daß Randkavitäten in MTP zu hohe oder zu niedrige Werte liefern; Ursache: Wahrscheinlich Temperaturgradienten
Reader	Mehrkanalphotometer zur Vermessung von Mikrotiterplatten
Replikate	Wiederholungsmessungen, falls nicht anderes angegeben: n=3
RIA	Radioimmunoassay (Immunoassay mit radioaktivem Tracer)
Rüttler	Siehe Schüttler
Sandwich-Technik	Nicht-kompetitiver Immunoassay (siehe Abb. 2)
Schüttler	Gerät zur Durchmischung von Reagenzien in Mikrotiterplatten
Selektivität	Kreuzreaktion (molar, basierend auf Testmittelpunkten)
Sensitivität	Nachweisgrenze
Spacer	Abstandhalter-Molekül (Brücke, Linker), oft eine Alkylkette
Spacer Recognition	Siehe Bridge Recognition
Spannweite	Höchster minus niedrigster Wert: Entspricht ungefähr 2 Standardabweichungen
Testmittelpunkt	50%-Wert (C), Wendepunkt der sigmoidalen Eichkurve
Tracer	Hier: Markierter Analyt (Enzym-Konjugat)
Unspezifische Adsorpt.	Hier: Bindung, die nicht mit einer immunologischen Reaktion zusammenhängt
Variolation	Künstlich erzeugte, milde Erkrankung an Pocken (historische Form einer Schutzimpfung, aus Indien, erstmals vor ca. 2000 Jahren)
Vibromischer	Siehe Schüttler
Vergleichgewicht	Nicht im üblichen Sinne bei Folgereaktionen, sondern zeitlich gesehen: Gleichgewicht während der Vorinkubationsphase
Wiederfindung(srate)	Prozentualer Anteil, des bei einem Analysenverfahren gefundenen Analyten, bezogen auf die Menge des zugesetzten Analyten

## X. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] THUKYDIDES: Der Peloponnesische Krieg, H. Vretska (Übers. u. Hrsg.), S. 172-173, Reclam, Stuttgart 1966.
- [2] C. ZINK: Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 256. Aufl., S. 812, 1513 u. 1758, De Gruyter, Berlin 1990.
- [3] J. A. DUDGEON: *Historical introduction*, in: Immunization - Principles and Practice, J. A. Dudgeon, W. A. M. Cutting (Eds.), pp. 1-26, Chapman and Hall, London 1991.
- [4] Zitiert in: K. EICHMANN: *Funktionen und Funktionsstörungen des Immunsystems*, in: Immunsystem: Abwehr und Selbsterkennung auf molekularem Niveau, 2. Aufl., G. Köhler (Ed.), S. 111-113, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg 1988.
- [5] E. VON BEHRING, S. KITASATO: *Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren*, Deutsche Medicinische Wochenschrift **16** (1890) 1113-1114.
- [6] A. VON WASSERMANN: *Die Seitenkettentheorie*, in: Paul Ehrlich - Eine Darstellung seines wissenschaftlichen Wirkens, Festschrift zum 60. Geburtstage des Forschers, S. 134-150, Verlag von Gustav Fischer, Jena 1914.
- [7] K. LANDSTEINER: *Die serologische Spezifität der Proteine*, in: Die Spezifität der serologischen Reaktionen, S. 28, Springer, Berlin 1933.
- [8] K. LANDSTEINER: *Serologische Reaktionen mit künstlichen Komplexantigenen und einfachen chemischen Substanzen*, in: Die Spezifität der serologischen Reaktionen, S. 75-101, Springer, Berlin 1933.
- [9] K. LANDSTEINER, J. VAN DER SCHEER: *Serological Differentiation of Steric Isomers*, J. Exp. Med. **18** (1928) 315-320.
- [10] K. LANDSTEINER, J. VAN DER SCHEER: *On Cross Reactions of Immune Sera to Azoproteins*, J. Exp. Med. **63** (1936) 325-339.
- [11] R. LORENZ: *Nachruf auf Svante Arrhenius*, Z. angew. Chem. **40** (1927) 1461-1465.
- [12] S. ARRHENIUS: Immunochemie, Anwendungen der physikalischen Chemie auf die Lehre von den physiologischen Antikörpern, A. Finkelstein (Übers.), Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1907.
- [13] E. H. RIESENFELD: *Svante Arrhenius (1859-1927)*, Ber. Deutsch. Chem. Ges. **63** (1930) A1-A40.
- [14] S. A. BERSON, R. S. YALOW: *Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods*, Nature **164** (1959) 1648-1649.

- 
- [15] S. A. BERSON, R. S. YALOW: *Recent Studies on Insulin-binding Antibodies*, Ann. N. Y. Acad. Sci. **82** (1959) 338-344.
- [16] R. S. YALOW, S. A. BERSON: *Immunoassay of Endogeneous Plasma Insulin in Man*, J. Clin. Invest. **39** (1960) 1157-1175.
- [17] S. A. BERSON, R. S. YALOW, A. BAUMANN, M. A. ROTHSCHILD, K. NEWERLY: *Insulin- $I^{131}$  Metabolism in Human Subjects: Demonstration of Insulin Binding Globulin in the Circulation of Insulin Treated Subjects*, J. Clin. Invest. **35** (1956) 170-190.
- [18] R. S. YALOW: *Radioimmunoassay: A Probe for the Fine Structure of Biologic Systems*, Science **288** (1978) 1236-1245.
- [19] R. P. EKINS: *The Estimation of Thyroxine in Human Plasma by an Electrophoretic Technique*, Clin. Chim. Acta **5** (1960) 453-459.
- [20] P. K. NAKANE, G. B. PIERCE: *Enzyme-labeled Antibodies: Preparation and Application for the Localization of Antigens*, J. Histochem. Cytochem. **14** (1967) 929-931.
- [21] S. AVRAMEAS, T. TERNYNCK: *Peroxidase Labelled Antibody and Fab Conjugates with Enhanced Intracellular Penetration*, Immunochemistry **8** (1971) 1175-1179.
- [22] E. ENGVALL, P. PERLMANN: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) - Quantitative Assay of Immunoglobulin G*, Immunochemistry, **8** (1971) 871-874.
- [23] E. ENGVALL, P. PERLMANN: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA - III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-labeled Anti-immunoglobulin in Antigen-coated Tubes*, J. Immunol. **109** (1972) 129-135.
- [24] B. K. VAN WEEMEN, A. H. W. M. SCHUURS: *Immunoassay Using Antigen-enzyme Conjugates*, FEBS Lett. **15** (1971) 232-236.
- [25] B. K. VAN WEEMEN, A. H. W. M. SCHUURS: *Immunoassay Using Hapten-enzyme Conjugates*, FEBS Lett. **24** (1972) 77-81.
- [26] G. KÖHLER, C. MILSTEIN: *Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity*, Nature **256** (1975) 495-497.
- [27] E. GHERARDI, C. MILSTEIN: *Original and Artificial Antibodies*, Nature **357** (1992) 201-202.
- [28] A. PLÜCKTHUN, J. STADLMÜLLER: *Catalytic Antibodies: Contribution from Engineering and Expression in Escherichia coli*, in: Catalytic Antibodies, Ciba Found. Symp. 159, pp. 103-112, Wiley, Chichester 1991.

- [29] W. HUSE: *Construction of Combinatorial Antibody Expression Libraries in Escherichia coli*, in: Catalytic Antibodies, Ciba Found. Symp. 159, pp. 91-102, Wiley, Chichester 1991.
- [30] A. PLÜCKTHUN: *Antibodies from Escherichia coli*, Nature **347** (1990) 497-498.
- [31] M. R. L. OWEN, A. GANDECHA, B. COCKBURN, G. C. WHITELAM: *The Expression of Antibodies in Plants*, Chemistry & Industry (1992) 406-408.
- [32] D. BARON: *Pflanzliche Antikörper - Herstellung monoklonaler Antikörper in transgenen Tabakpflanzen*, BL-Journal **1** (1991) 69-72.
- [33] J. C. SMITH: *Evolution of the Immunoassay*, In: Development and Application of Immunoassay for Food Analysis, J. H. Rittenburg (Ed.), pp. 3-27, Elsevier, Essex 1990.
- [34] J. H. RITTENBURG: *Fundamentals of Immunoassay*, In: Development and Application of Immunoassay for Food Analysis, J. H. Rittenburg (Ed.), pp. 29-57, Elsevier, Essex 1990.
- [35] T. PORSTMANN, S. T. KIESSIG: *Enzyme Immunoassay Techniques: An Overview*, J. Immunol. Meth. **150** (1992) 5-21.
- [36] R. LINKE, R. KÜPPERS: *Nicht-isotopische Immunoassays - Ein Überblick*, in: Analytiker-Taschenbuch, Bd. 8, R. Borsdorf, W. Fresenius, H. Günzler, W. Huber, H. Kelker, I. Lüderwald, G. Tölg, H. Wisser (Hrsg.), S. 127-177, Springer, Berlin 1989.
- [37] R. R. PORTER: *Der Aufbau von Antikörpern*, in: Immunsystem: Abwehr und Selbsterkennung auf molekularem Niveau, 2. Aufl., G. Köhler (Ed.), S. 34-42, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg 1988.
- [38] I. WEEKS: *Immunoassay*, in: Chemiluminescence Immunoassay, G. Svehla (Ed.), pp. 83-87, Elsevier, Amsterdam 1992.
- [39] R. M. NAKAMURA, A. VOLLER, D. E. BIDWELL: *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, in: Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1: Immunochemistry, D. M. Weir (Ed.), 27.1-27.20, Blackwell Scientific Publications, Oxford 1986.
- [40] R. C. VALENTINE, N. M. GREEN, *Electron Microscopy of an Antibody-hapten Complex*, J. Molec. Biol. **27** (1967) 615-617.
- [41] P. TIJSEN: *Outline of the Strategies for Enzyme Immunoassays*, in: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds.), p. 10, Elsevier, Amsterdam 1985.
- [42] C. KEUCHEL: *Persönliche Mitteilung*, Institut für Wasserchemie, Technische Universität München 1992.

- [43] S. H. JENKINS: *Homogeneous Enzyme Immunoassay*, J. Immunol. Meth. **150** (1992) 91-97.
- [44] S. A. LEVISON, F. KIERZENBAUM, W. B. DANDLIKER: *Salt Effects of Antigen-antibody Kinetics*, Biochemistry **9** (1970) 322-331.
- [45] D. J. LITMAN, T. M. HANLON, E. F. ULLMAN: *Enzyme Channeling Immunoassay: A New Homogeneous Enzyme Immunoassay Technique*, Anal. Biochem. **106** (1980) 223-229.
- [46] J. H. RITTENBURG, G. D. GROTHAUS, D. A. FITZPATRICK, R. K. LANKOW: *Rapid On-site Immunoassay Systems*, in: Immunoassays for Trace Chemical Analysis, M. Vanderlaan, L. H. Stanker, B. E. Watkins, D. W. Roberts (Eds.), pp. 28-39, ACS, Washington 1990.
- [47] T. GIERSCH, K. KRAMER, B. HOCK: *Optimization of a Monoclonal Antibody-based Enzyme Immunoassay for the Detection of Terbutylazine*, Sci. Total Environ. (1992), im Druck.
- [48] C. KEUCHEL: *Persönliche Mitteilung*, Institut für Wasserchemie, Technische Universität München 1992.
- [49] A. ZETTNER: *Principles of Competitive Binding Assays (Saturation Analyses). I. Equilibrium Techniques*, Clin. Chem. **19** (1973) 699-705.
- [50] H.-D. JAKUBKE, H. JESCHKEIT: Aminosäuren, Peptide, Proteine, 1. Aufl., S. 63, Akademie, Berlin 1969.
- [51] A. J. PESCE, J. G. MICHAEL: *Artifacts and Limitations of Enzyme Immunoassay*, J. Immunol. Meth. **150** (1992) 111-119.
- [52] Zitiert in: Analytikum, 8. Aufl., S. 393-395 u. 407, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1990.
- [53] J. K. JOHANNESSON: *Isotopic-dilution Analysis with a Modified Substoichiometric Residue Method for Carbonate and Sulfate*, Analyst **92** (1967) 766-768.
- [54] H. DENZINGER: *Die Anwendung radiochemischer Tracermethoden zur Bestimmung einiger Spurenstoffe in der Atmosphäre*, S. 30, Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg 1975.
- [55] A. L. LEHNINGER: Biochemie, 2. Aufl., S. 822-826, VCH, Weinheim 1985.
- [56] P. TUISSEN: *The Nature and Structure of Antibodies*, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds.), pp. 79-93, Elsevier, Amsterdam 1985.



- [57] P. LEDER: *Die Vielfalt der Antikörper*, in: Immunsystem: Abwehr und Selbsterkennung auf molekularem Niveau, 2. Aufl., G. Köhler (Ed.), S. 64-76, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg 1988.
- [58] S. TONEGAWA: *Die Moleküle des Immunsystems*, in: Immunsystem: Abwehr und Selbsterkennung auf molekularem Niveau, 2. Aufl., G. Köhler (Ed.), S. 78-87, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg 1988.
- [59] N. K. JERNE: *Das Immunsystem*, in: Immunsystem: Abwehr und Selbsterkennung auf molekularem Niveau, 2. Aufl., G. Köhler (Ed.), S. 54-63, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg 1988.
- [60] SIR M. BURNET: *Die Mechanismen der Immunität*, in: Immunsystem: Abwehr und Selbsterkennung auf molekularem Niveau, 2. Aufl., G. Köhler (Ed.), S. 12-22, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg 1988.
- [61] J. J. MONACO: *A Molecular Model of MHC Class-I-restricted Antigen Processing*, Immunology Today 13 (1992) 173-179.
- [62] G. KÖHLER: *Die Erkennungsmoleküle des Immunsystems*, in: Immunsystem: Abwehr und Selbsterkennung auf molekularem Niveau, 2. Aufl., G. Köhler (Ed.), S. 8-11, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg 1988.
- [63] H. BAUMGARTEN: *Auswahl des Immunogens*, in: Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung, 2. Aufl., J.H. Peters, H. Baumgarten (Eds.), S. 42-46, Springer, Berlin 1988.
- [64] U. GRAWUNDER, D. HAASNER: *Antikörper - Wie die Natur eine chemische Struktur beliebig variiert*, Chemie in unserer Zeit 26 (1992) 175-186.
- [65] K. A. SHARP, A. NICHOLLS, R. F. FINE, B. HONIG: *Reconciling the Magnitude of the Microscopic and Macroscopic Hydrophobic Effects*, Science 252 (1991) 106-109.
- [66] P. TIJSSEN: *Kinetics and Nature of Antibody-antigen Interactions*, in: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds.), p. 123-124, Elsevier, Amsterdam 1985.
- [67] I. A. WILSON, R. L. STANFIELD, J. M. RINI, J. H. AREVALO, U. SCHULZE-GAHMEN, D. H. FREMONT, E. A. STURA: *Structural Aspects of Antibodies and Antibody-antigen Complexes*, in: Catalytic Antibodies, Ciba Found. Symp. 159, pp. 13-28, Wiley, Chichester 1991.
- [68] J. ANGLISTER: *Use of Deuterium Labelling in NMR Studies of Antibody Combining Site Structure*, Quarterly Reviews of Biophysics 23 (1990) 175-203.
- [69] M. FRÁNEK, K. HRUSKA: *Specificity of the Immune Response to the Oestrone-azo-hapten Structure*, J. Steroid Biochem. 22 (1985) 341-347.

- [70] T. CHARD: *Requirements for Binding Assays - Antibodies and Other Binders, An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds.), pp. 90-91, Elsevier, Amsterdam 1987.
- [71] R. J. POLJAK, L. M. AMZEL, H. P. AVEY, B. L. CHEN, R. P. PHIZACKERLEY, F. SAUL: *Three-Dimensional Structure of the Fab' Fragment of a Human Immunoglobulin at 2.8-Å Resolution*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70** (1973) 3305-3310.
- [72] R. GLOCKSHUBER, M. MALIA, I. PFITZINGER, A. PLÜCKTHUN: *A Comparison of Strategies to Stabilize Immunoglobulin F<sub>v</sub>-fragments*, Biochemistry **29** (1990) 1362-1367.
- [73] K. KÄPIAHO, B. M. ANDERSSON: *Optimization of Coating Parameters in Microplate Immunoassays*, European Clinical Laboratory **4** (1992) 14.
- [74] J. H. PETERS, D. BARON: *Eigenschaften und Bedeutung monoklonaler Antikörper*, in: Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung, 2. Aufl., J.H. Peters, H. Baumgarten (Eds.), S. 4-11, Springer, Berlin 1988.
- [75] J. MARX: *Learning How to Bottle the Immune System*, Science **246** (1989) 1250-1281.
- [76] J. M. ANCHIN, D. S. LINTHICUM: *Molecular and Computational Techniques for Modelling Antibody Combining Sites*, J. Clin. Immunoassay **15** (1992) 35-41.
- [77] F. VÖGTLE: Supramolekulare Chemie, Teubner, Stuttgart 1989.
- [78] B. PORSTMANN, T. PORSTMANN, E. NUGEL, U. EVERS: *Which of the Commonly Used Marker Enzymes Gives the Best Results in Colorimetric and Fluorimetric Enzyme Immunoassays: Horseradish Peroxidase, Alkaline Phosphatase or β-Galactosidase?*, J. Immunol. Meth. **79** (1985) 27-37.
- [79] E. S. BOS, A. A. VAN DER DOELEN, N. VAN ROOY, A. H. W. M. SCHUURS: *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as an Ames Test Negative Chromogen for Horse-Radish Peroxidase in Enzyme-immunoassay*, J. Immunoassay **2** (1981) 187-204.
- [80] H. GALLATI: *Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin*, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **23** (1985) 453-460.
- [81] H. GALLATI: *Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien sowie Optimierung der Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure-(6)) (ABTS)*, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **17** (1979) 1-7.
- [82] R. W. BALLY, T. C. J. GRIBNAU: *Some Aspects of the Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as Hydrogen Donor in a Horseradish Peroxidase Assay*, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **27** (1989) 791-796.

- [83] G. G. GUILBAULT, P. BRIGNAC, JR., M. ZIMMER: *Homovanillic Acid as a Fluorometric Substrate for Oxidative Enzymes - Analytical Applications of the Peroxidase, Glucose Oxidase, and Xanthine Oxidase Systems*, Anal. Chem. **40** (1968) 190-196.
- [84] B. B. KIM, V. V. PISAREV, A. M. EGOROV: *A Comparative Study of Peroxidases from Horse Radish and *Arthromyces ramosus* as Labels in Luminol-mediated Chemiluminescent Assays*, Anal. Biochem. **199** (1991) 1-6.
- [85] S. AIBARA, H. YAMASHITA, E. MORI, M. KATO, Y. MORITA: *Isolation and Characterization of Five Neutral Isoenzymes of Horseradish Peroxidase*, J. Biochem. **92** (1982) 531-539.
- [86] K. G. WELINDER: *Plant Peroxidases - Their Primary, Secondary and Tertiary Structures, and Relation to Cytochrome C Peroxidase*, Eur. J. Biochem. **151** (1985) 497-504.
- [87] K. FUJIYAMA, H. TAKEMURA, S. SHIBAYAMA, K. KOBAYASHI, J.-K. CHOI, A. SHINMYO, M. TAKANO, Y. YAMADA, H. OKADA: *Structure of the Horseradish Peroxidase Isozyme C Genes*, Eur. J. Biochem. **173** (1988) 681-687.
- [88] P. TIJSSEN: *Properties and Preparation of Enzymes Used in Enzyme-immunoassays*, in: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds.), pp. 173-219, Elsevier, Amsterdam 1985.
- [89] Peroxidase - The Properties and Uses of a Versatile Enzyme and of Some Related Catalysts, B. C. Saunders, A. G. Holmes-Siedle, B. P. Stark (Eds.), Butterworths, London 1964.
- [90] H. B. DUNFORD: *Horseradish Peroxidase: Structure and Kinetic Properties*, in: Peroxidases in Chemistry and Biology, Vol. II, pp. 1-24, J. Everse, K. E. Everse, M. B. Grisham (Eds.), CRC, Boca Raton, 1991.
- [91] K. G. WELINDER: *Covalent Structure of the Glycoprotein Horseradish Peroxidase (EC 1.11.1.7)*, FEBS Letters **72** (1976) 19-23.
- [92] K. G. WELINDER: *Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase - Amino and Carboxyl Termini, Cyanogen Bromide and Tryptic Fragments, the Complete Sequence, and Some Structural Characteristics of Horseradish Peroxidase C*, Eur. J. Biochem. **96** (1979) 483-502.
- [93] J. CLARKE, L. M. SHANNON: *The Isolation and Characterization of the Glycopeptides from Horseradish Peroxidase Isoenzyme C*, Biochim. Biophys. Acta **427** (1976) 428-442.
- [94] Y. SHIRO, M. KURONO, I. MORISHIMA: *Presence of Endogeneous Calcium Ion and Its Functional and Structural Regulation in Horseradish Peroxidase*, J. Biol. Chem. **261** (1986) 9382-9390.

- 
- [95] R. H. HASCHKE, J. M. FRIEDHOFF: *Calcium-related Properties of Horseradish Peroxidase*, Biochem. Biophys. Res. Comm. **80** (1978) 1039-1042.
- [96] J. CARLSSON, H. DREVIN, R. AXÉN: *Protein Thiolation and Reversible Protein-protein Conjugation*, Biochem. J. **173** (1978) 723-737.
- [97] E. CLAASSEN, N. VAN ROOIJEN: *A Trinitrophenyl(TNP)-poly-L-lysine-horseradish Peroxidase Conjugate for the Detection of Anti-TNP Antibodies In Vivo*, J. Histochem. Cytochem. **33** (1985) 840-844.
- [98] L. MORODER, G. MOURIER, G. BOVERMANN, M. DUFRESNE, W. GÖHRING, M. GEMEINER, E. WÜNSCH: *IV. New Synthesis of a Gastrin/Peroxidase Conjugate*, Biol. Chem. Hoppe-Seyler **368** (1987) 849-853.
- [99] A. BIERMANN, G. TERPLAN: *Nachweis von Aflatoxin B<sub>1</sub> mittels ELISA*, Archiv für Lebensmittelhygiene **31** (1980) 51-57.
- [100] J. P. GOSLING: *A Decade of Development in Immunoassay Methodology*, Clin. Chem. **36** (1990) 1408-1427.
- [101] R. KARLSSON, A. MICHAELSSON, L. MATTSSON: *Kinetic Analysis of Monoclonal Antibody-antigen Interactions with a New Biosensor Based Analytical System*, J. Immunol. Meth. **145** (1991) 229-240.
- [102] S. J. CHOQUETTE, L. LOCASCIO-BROWN, R. A. DURST: *Planar Waveguide Immunosensor with Fluorescent Liposome Amplification*, Anal. Chem. **64** (1992) 55-60.
- [103] T. CHARD: *Requirements for Binding Assays - Tracer Using Radioisotopic Labels*, in: An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, 3rd. Ed., R. H. Burdon, P.H. van Knippenberg (Eds.), pp. 40-67, Elsevier, Amsterdam 1987.
- [104] G. SOKOŁOWSKI, W. G. WOOD: Radioimmunoassay in Theorie und Praxis, Schnetztor, Konstanz 1981.
- [105] T. M. JACKSON, R. P. EKINS: *Theoretical Limitations on Immunoassay Sensitivity - Current Practice and Potential Advantages of Fluorescent Eu<sup>3+</sup> Chelates as Non-radioisotopic Tracers*, J. Immunol. Meth. **87** (1986) 13-20.
- [106] K. H. MILBY: *Fluorimetric Measurements in Enzyme Immunoassays*, in: Nonisotopic Immunoassay, pp. 325-341, T. T. Ngo (Ed.), Plenum Press, New York 1988.
- [107] J. GRASSI, P. PRADELLES: *The Use of Acetylcholinesterase as a Universal Marker in Enzyme-immunoassays*, Proc. 3rd Int. Meeting on Cholinesterases, La Grande Motte 1990, pp. 221-226, American Chemical Society, Washington, DC 1991.
- [108] A. P. SCHAAP, H. AKHAVAN, L. J. ROMANO: *Chemiluminescent Substrates for Alkaline Phosphatase: Application to Ultrasensitive Enzyme-linked Immunoassays and DNA Probes*, Clin. Chem. **35** (1989) 1863-1864.

- [109] S. BECK, H. KÖSTER: *Applications of Dioxetane Chemiluminescent Probes to Molecular Biology*, Anal. Chem. **62** (1990) 2258-2270.
- [110] A. JOHANSSON, D. H. ELLIS, D. L. BATES, A. M. PLUMB, C. J. STANLEY: *Enzyme Amplification for Immunoassays - Detection Limit of One Hundredth of an Attomole*, J. Immunol. Meth. **87** (1986) 7-11.
- [111] K. TANAKA, E. ISHIKAWA: *A Highly Sensitive Bioluminescent Assay of  $\beta$ -D-Galactosidase from Escherichia coli Using 2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside as a Substrate*, Anal. Lett. **19** (1986) 433-444.
- [112] M. MAEDA, S. SHIMIZU, A. TSUJI: *Chemiluminescence Assay of  $\beta$ -D-Galactosidase and its Application to Competitive Immunoassay for  $17\alpha$ -Hydroxyprogesterone and Thyroxine*, Anal. Chim. Acta **266** (1992) 213-217.
- [113] G. SCHWEDT: Fluorimetrische Analyse, Verlag Chemie, Weinheim 1981.
- [114] I. A. HEMMILÄ: Applications of Fluorescence in Immunoassays, pp. 78-80, J. D. Winefordner, I. M. Kolthoff (Eds.), Wiley, New York 1991.
- [115] I. WEEKS: Chemiluminescence Immunoassay, G. Svehla (Ed.), pp. 96-98, Elsevier, Amsterdam 1992.
- [116] M. GROL, M. SCHULZE: *Immunoassays für lösliche Antigene: Ein Überblick*, in: Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung, 2. Aufl., J.H. Peters, H. Baumgarten (Eds.), S. 322, Springer, Berlin 1988.
- [117] J. H. PETERS, M. SCHULZE, M. GROL: *Wie finde ich den richtigen monoklonalen Antikörper?*, in: Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung, 2. Aufl., J.H. Peters, H. Baumgarten (Eds.), S. 318, Springer, Berlin 1988.
- [118] L. MÜLLER: *Entwicklung und Prüfung von neuen fluoreszierenden Atrazinreagern zur Anwendung in immunserologischen Tests zum Nachweis von Pestiziden*, Diplomarbeit, Universität Dortmund, Lehrbereich Anorganische Chemie, Dortmund 1991.
- [119] BIOZYME Laboratories Ltd.: Peroxidase Product Information, HRP/04/92/R3, Blaenavon 1992.
- [120] Z. WENG, M. HENDRICKX, G. MAESMANS, K. GEBRUERS, P. TOBBACK: *Thermostability of Soluble and Immobilized Horseradish Peroxidase*, J. Food Sci. **56** (1991) 574-578.
- [121] F. EBERHARDT: *Entwicklung von Immunoassays und Markierungsmethoden für die Bestimmung von Schimmelpilzgiften mit immunooptischen Biosensoren*, Dissertation, Fachbereich Chemie der Universität Hannover, 1991.
- [122] W.G. WOOD, A. GADOW: *Immobilization of Antibodies and Antigens on Macro Solid Phases - A Comparison Between Adsorptive and Covalent Binding*, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **21** (1983) 789-797.

- 
- [123] HELMA Information: *Mikrotestplatten aus Quarzglas*, HELMA GmbH & Co., 7840 Müllheim, 1992.
- [124] V. R. HOLLAND, B. C. SAUNDERS, F. L. ROSE, A. L. WALPOLE: *A Safer Substitute for Benzidine in the Detection of Blood*, Tetrahedron **30** (1974) 3299-3302.
- [125] C. E. VOOGD, J. J. VAN DER STEL, J. J. J. A. A. JACOBS: *On the Mutagenic Action of Some Enzyme Immunoassay Substrates*, J. Immunol. Meth. **36** (1980) 55-61.
- [126] P. D. JOSEPHY, T. ELING, R. P. MASON: *The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine - Free Radical and Charge-transfer Complex Intermediates*, J. Biol. Chem. **257** (1982) 3669-3675.
- [127] D. RODBARD: *Mathematics and Statistics of Ligand Assays: An Illustrated Guide*, in: Ligand Assay, pp. 45-101, J. Langan, J. J. Clapp (Eds.), Masson, New York 1981.
- [128] D. S. BUNCH, D. M. ROCKE, R. O. HARRISON: *Statistical Design of ELISA Protocols*, J. Immunol. Meth. **132** (1990) 247-254.
- [129] S. A. RUDIN: *Die Kunst, die rechte Skala zu verwenden*, J. unwiederh. Exp. **2** (1989) 60-62.
- [130] C. CAMPBELL: *Simple Linear Regression*, in: Handbook of Chemical Property Estimation Methods, pp. B 1-30, W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (Eds.), American Chemical Society, Washington, DC 1990.
- [131] R. J. LEATHERBARROW: *Using Linear and Non-linear Regression to Fit Biochemical Data*, Trends in Biochemical Sciences (TIBS) **15** (1990) 455-458.
- [132] J. BERKSON: *Application of the Logistic Function to Bio-assay*, J. Amer. Statist. Assoc. **39** (1944) 357-365.
- [133] W. SHAW, J. SMITH, F. W. SPIERTO, S. T. AGNESE: *Linearization of Data for Saturation-type Competitive Protein Binding Assay and Radioimmunoassay*, Clin. Chim. Acta **76** (1977) 15-24.
- [134] D. RODBARD, P. L. RAYFORD, J. A. COOPER, G. T. ROSS: *Statistical Quality Control of Radioimmunoassays*, J. Clin. Endocrin. **28** (1968) 1412-1418.
- [135] R. P. EKINS: *Basic Principles and Theory*, Brit. Med. Bull. **30** (1974) 3-11.
- [136] R. A. DUDLEY, P. EDWARDS, R. P. EKINS, D. J. FINNEY, I. G. M. MCKENZIE, G. M. RAAB, D. RODBARD, AND R. P. C. RODGERS: *Guidelines for Immunoassay Data Processing*, Clin. Chem. **31** (1985) 1264-1271.
- [137] R. EKINS: *The "Precision Profile": Its Use in RIA Assessment and Design*, Ligand Quarterly **4/2** (1981) 33-44.

- [138] G. M. RAAB: *Comparison of a Logistic and a Mass-action Curve for Radioimmunoassay Data*, Clin. Chem. **29** (1983) 1757-1761.
- [139] P. VANKEERBERGHEN, C. VANDENBOSCH, J. SMEYERS-VERBEKE, D. L. MASSART: *Some Robust Statistical Procedures Applied to the Analysis of Chemical Data*, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems **12** (1991) 3-13.
- [140] W. H. PRESS, B. P. FLANNERY, S. A. TEUKOLSKY, W. T. VETTERLING: Numerical Recipes in Pascal - The Art of Scientific Computing, pp. 590-598, Cambridge University Press, Cambridge 1989.
- [141] P. J. ROUSSEUW: *Tutorial to Robust Statistics*, J. Chemometrics **5** (1991) 1-20.
- [142] H. STREULI: *Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißer-Tests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden*, Fresenius Z. Anal. Chem. **303** (1980) 406-408.
- [143] E. MORGAN, K. W. BURTON: *Optimization Using the Modified Simplex Method*, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems **7** (1990) 209-222.
- [144] E. MORGAN, K. W. BURTON: *Optimization Using the Super-modified Simplex Method*, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems **8** (1990) 97-107.
- [145] K. A. HASSALL: The Chemistry of Pesticides - Their Metabolism, Mode of Action and Uses in Crop Protection, pp. 1-2, Macmillan, London 1982.
- [146] The Pesticide Manual, 9th Ed., p. 917, C. R. Worthing, R. J. Hance (Eds.), British Crop Protection Council, Farnham 1991.
- [147] E. KNÜSLI: *History of the Development of Triazine Herbicides*, Residue Reviews, Vol. 32, F.A. Gunther, J.D. Gunther (Eds.), pp. 1-9, Springer, Berlin 1970.
- [148] A. GAST, E. KNÜSLI, H. GYSIN: *Über Pflanzenwachstumsregulatoren*, Experientia **XI** (1955) 107-108.
- [149] A. GAST, E. KNÜSLI, H. GYSIN: *Über Pflanzenwachstumsregulatoren*, Experientia **XII** (1956) 146-148.
- [150] H. GYSIN, E. KNÜSLI: *Mittel zur Beeinflussung des Pflanzenwachstums*, Deutsches Patentamt, Auslegeschrift 1 011 904, J. R. Geigy A.-G., Basel, 16. August 1955.
- [151] G. SZÉKELY, P. WEICK, B. ABT: *Determination of Atrazine Traces in Ground and Drinking Water by Thin Layer Chromatography*, J. Planar Chromatography **2** (1989) 321-322.

- [152] E. KNÜSLI: *Atrazine*, in: Analytical Methods for Pesticides, Plant Growth Regulators, and Food Additives, Vol. IV, pp. 33-36, G. Zweig (Ed.), Academic Press, New York 1964.
- [153] K. H. BÜCHEL (Hrsg.): Pflanzenschutz und Schädlingsbekämpfung, S. 183-187, Thieme, Stuttgart 1977.
- [154] A. E. SMITH, D. C. G. MUIR, R. GROVER: *The Triazine Herbicides*, in: Analysis of Pesticides in Water, Vol. III, A. S. Y. Chan, B. K. Afghan (Eds.), pp. 213-239, CRC, Boca Raton 1982.
- [155] H. AIZAWA: Metabolic Maps of Pesticides, pp. 195-199, Academic Press, New York 1982.
- [156] D. D. KAUFMAN, P. C. KEARNEY: *Microbial Degradation of s-Triazine Herbicides*, in: Residue Reviews, Vol. 32, F. A. Gunther, J. D. Gunther (Eds.), pp. 235-265, Springer, Berlin 1970.
- [157] K. A. HASSALL: The Chemistry of Pesticides - Their Metabolism, Mode of Action and Uses in Crop Protection, pp. 306-309, Macmillan, London 1982.
- [158] J. DEISENHOFER, H. MICHEL: *Das photosynthetische Reaktionszentrum des Purpurbakteriums Rhodospseudomonas viridis (Nobel-Vortrag)*, Angew. Chem. **101** (1989) 872-892.
- [159] I. SINNING: *Herbicide Binding in the Bacterial Photosynthetic Reaction Center*, Trends in Biochemical Sciences (TIBS) **17** (1992) 150-154.
- [160] W. DRABER, J. F. KLUTH, K. TIETJEN, A. TREBST: *Herbizide in der Photosyntheseforschung*, Angew. Chem. **103** (1991) 1650-1663.
- [161] E. KNOLL: *Radioimmunoassay*, in: Analytiker-Taschenbuch, Bd. 8, R. Borsdorf, W. Fresenius, H. Günzler, W. Huber, H. Kelker, I. Lüderwald, G. Tölg, H. Wisser (Hrsg.), S. 93-125, Springer, Berlin 1989.
- [162] J. A. CLAYTON HOPKINS, L. EDWARDS, A. E. HERNER, P. VAN DREAL (Eds.): *The Chemists' Guide to Radioassay Products*, Clin. Chem. **23** (1977) 403-446.
- [163] K. BORNER: *Die Bestimmung von Gesamtthyroxin im Serum - Erfahrungen mit einem heterogenen Enzymimmunoassay (ELISA)*, in: Praktische Anwendung des Enzymimmunoassays in klinischer Chemie und Serologie, S. 20, W. Vogt (Hrsg.), Thieme, Stuttgart 1979.
- [164] C. ZINK: Psyhyrembel Klinisches Wörterbuch, 256. Aufl., S. 1517-1518, De Gruyter, Berlin 1990.
- [165] M. OELLERICH: *Die vollmechanisierte Bestimmung von Theophyllin mit dem homogenen Enzymimmunotest*, in: Praktische Anwendung des Enzymimmunoassays in klinischer Chemie und Serologie, S. 85, W. Vogt (Hrsg.), Thieme, Stuttgart 1979.



- [166] J. G. HAAS, E. J. GUARDIA: *Production of Antibodies Against Insecticide-protein Conjugates*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **129** (1968) 546-551.
- [167] E. R. CENTENO, W. J. JOHNSON, A. H. SEHON: *Antibodies to Two Common Pesticides, DDT and Malathion*, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **37** (1970) 1-13.
- [168] J. J. LANGONE, H. VAN VUNAKIS: *Radioimmunoassay for Dieldrin and Aldrin*, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. **10** (1975) 163-171.
- [169] M. VANDERLAAN, B. E. WATKINS, L. STANKER: *Environmental Monitoring by Immunoassay*, Environ. Sci. Technol. **22** (1988) 247-254.
- [170] K. HABERER, P. KRÄMER: *Verfügbarkeit immunochemischer Nachweisverfahren für Pflanzenschutzmittel im Wasser*, Vom Wasser **71** (1988) 231-244.
- [171] N. REICHERT, S. VIETHS, P. FRIESEL, H. KERNDORFF: *Literaturstudie zur Anwendbarkeit immunochemischer Methoden in der Pflanzenschutzmittel- und Umweltanalytik*, WaBoLu Hefte 3/1997, Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes, Berlin 1988.
- [172] E. MÄRTLBAUER: *Enzymimmunoassays in der Rückstandsanalytik: Entwicklung und Charakterisierung*, Archiv für Lebensmittelhygiene **43** (1992) 34-35.
- [173] K. J. HUBER: *Der Einsatz des Enzym-Immunoassays zum Nachweis luftverfrachteter Pestizide - Entwicklung eines Probenahmesystems*, Diplomarbeit, Fakultät Chemie, Biologie und Geowissenschaften der Technischen Universität München, 1992.
- [174] K. J. HUBER, L. WEIL, R. NIESSNER: *Total Deposition of the Triazine Herbicide Atrazine by Use of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, Fresenius J. Anal. Chem. **343** (1992) 146.
- [175] P. FRUHSTORFER, R. J. SCHNEIDER, L. WEIL, R. NIESSNER: *Factors Influencing the Adsorption of Atrazine on Montmorillonitic and Kaolinitic Clays*, Sci. Total Environ., 1992, im Druck.
- [176] R. J. SCHNEIDER, L. WEIL, R. NIESSNER: *Screening and Monitoring of Herbicides Behaviour in Soils by Enzyme Immunoassays*, Intern. J. Environ. Anal. Chem. **46** (1992) 129-140.
- [177] S. J. WRATTEN, P. C. C. FENG: *Pesticide Analysis by Immunoassay*, In: Development and Application of Immunoassay for Food Analysis, J. H. Rittenburg (Ed.), pp. 201-220, Elsevier, Essex 1990.
- [178] B. D. HAMMOCK, S. J. GEE, P. Y. K. CHEUNG, T. MIYAMOTO, M. H. GOODROW, J. VAN EMON, J. N. SEIBER: *Utility of Immunoassay in Pesticide Trace Analysis*, in: Proc. 6th Int. Cong. Pesticide Chemistry, Ottawa, R. Greenhalgh, T.R. Roberts (Eds.), pp. 309-316, Blackwell, Oxford 1986.

- [179] T. RUPPERT: *Validierung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) zur Bestimmung von Triazinherbiziden im Wasser*, Dissertation, Technische Universität München, 1992.
- [180] R. O. MUMMA, J. F. BRADY: *Immunological Assays for Agrochemicals*, in: Pesticide Science and Biotechnology, pp. 341-348, R. Greenhalgh, T. R. Roberts (Eds.), Blackwell, Oxford 1986.
- [181] C. WITTMANN, B. HOCK: *Marktübersicht - Immunoassays zum Nachweis von Pestiziden und Umweltchemikalien*, Nachr. Chem. Tech. Lab. **39** (1991) M2-M40.
- [182] S. J. HUBER: *Improved Solid-phase Enzyme Immunoassay Systems in the ppt Range for Atrazine in Fresh Water*, Chemosphere **14** (1985) 1795-1803.
- [183] S. J. HUBER, B. HOCK: *A Solid-phase Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of the Herbicide Terbutryn*, J. Plant Diseases and Protection **92** (1985) 147-156.
- [184] S. J. HUBER, B. HOCK: *Solid-Phase-Enzymimmunoassay zum Nachweis von Pflanzenschutzmitteln in Gewässern*, GIT Fachz. Lab., Oktober (1985).
- [185] R. J. BUSHWAY, B. PERKINS, S. A. SAVAGE, S. J. LEKOUSI, B. S. FERGUSON: *Determination of Atrazine Residues in Water and Soil by Enzyme Immunoassay*, Bull. Environ. Contam. Toxicol. **40** (1988) 647-654.
- [186] B. DUNBAR, B. RIGGLE, G. NISWENDER: *Development of Enzyme Immunoassay for the Detection of Triazine Herbicides*, J. Agric. Food Chem. **38** (1990) 433-437.
- [187] J.-M. SCHLAEPPI, W. FÖRY, K. RAMSTEINER: *Hydroxyatrazine and Atrazine Determination in Soil and Water by Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Specific Monoclonal Antibodies*, J. Agric. Food Chem. **37** (1989) 1532-1538.
- [188] J.-M. SCHLAEPPI, W. FÖRY, K. RAMSTEINER: *Monoclonal Antibody-based Enzyme Immunoassay for Atrazine and Hydroxyatrazine*, in: Immunochemical Methods in Environmental Analysis, pp. 199-210, ACS Symp. Ser. 442, J. M. Van Emon, R. O. Mumma (Eds.), ACS, Washington, DC 1990.
- [189] W. PFEIFFER, R. H. DITTEL, W. MIES: *Immunological Detection of Triazine Herbicides*, Eur. Pat. Appl. EP 300,381 (Cl. G01N33/53) 25 Jan 1989, DE Appl. 3,723,726 17 Jul 1987.
- [190] S. J. HUBER, B. HOCK: *Atrazine in Water*, in: Methods of Enzymatic Analysis, 3rd. Ed., Vol. XII, H.-U. Bergmeyer (Ed.), pp. 438-456, VCH, Weinheim 1986.
- [191] B. HOCK: *Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Pflanzenschutzmitteln im Wasser*, Z. Wasser- Abwasser-Forsch. **22** (1989) 78-84.

- [192] S. WÜST, U. DOHT, T. GIERSCH, C. WITTMANN, B. HOCK: *Sensitiver s-Triazin-Enzymimmunoassay für Wasserproben in Polystyrol-Röhrchen*, GIT Fachz. Lab. Nr.2 (1990) 99-106.
- [193] M. H. GOODROW, R. O. HARRISON, B. D. HAMMOCK: *Hapten Synthesis, Antibody Development, and Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay for s-Triazine Herbicides*, J. Agric. Food Chem. **38** (1990) 990-996.
- [194] C. WITTMANN, B. HOCK: *Improved Enzyme Immunoassay for the Analysis of s-Triazines in Water Samples*, Food and Agricultural Immunology **1** (1989) 211-224.
- [195] C. WITTMANN, B. HOCK: *Development of an ELISA for the Analysis of Atrazine Metabolites Deethylatrazine and Deisopropylatrazine*, J. Agric. Food Chem. **39** (1991) 1194-1200.
- [196] S. WÜST, B. HOCK: *A Sensitive Enzyme Immunoassay for the Detection of Atrazine Based upon Sheep Antibodies*, Anal. Lett. **25** (1992) 1025-1037.
- [197] C. WITTMANN, B. HOCK: *Evaluation and Performance Characteristics of a Novel ELISA for the Quantitative Analysis of Atrazine in Water, Plants and Soil*, Food and Agricultural Immunology **2** (1990) 65-74.
- [198] R. O. HARRISON, M. H. GOODROW, B. D. HAMMOCK: *Competitive Inhibition ELISA for the s-Triazine Herbicides: Assay Optimization and Antibody Characterization*, J. Agric. Food Chem. **39** (1991) 122-128.
- [199] C. WITTMANN, B. HOCK: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays zur quantitativen Bestimmung von Atrazin und Atrazin-Metaboliten*, Z. Wasser- Abwasser-Forsch. **24** (1991) 2-7.
- [200] T. GIERSCH: *Herstellung monoklonaler Antikörper gegen s-Triazine*, Z. Wasser- Abwasser-Forsch. **24** (1991) 7-9.
- [201] T. GIERSCH, B. HOCK: *Production of Monoclonal Antibodies for the Determination of s-Triazines with Enzyme Immunoassays*, Food and Agricultural Immunology **2** (1990) 85-97.
- [202] C. WITTMANN, B. HOCK: *ELISAs zur Bestimmung von Atrazin und Atrazin-Metaboliten im Wasser*, Vom Wasser **75** (1990) 115-126.
- [203] J. A. VERSCHOOR, N. M. J. VERMEULEN, L. VISSER: *Haptenated Nylon-coated Polystyrene Plates as a Solid Phase for ELISA*, J. Immunol. Meth. **127** (1990) 43-49.
- [204] B. HOCK: *Immunologische Methoden*, in: Analytik für Mensch und Umwelt, S.59-66, VCH, Weinheim 1990.

- [205] A. E. KARU, R. O. HARRISON, D. J. SCHMIDT, C. E. CLARKSON, J. GRASSMAN, M. H. GOODROW, A. LUCAS, B. D. HAMMOCK, J. M. VAN EMON, R. J. WHITE: *Monoclonal Immunoassay of Triazine Herbicides*, in: Immunoassays for Trace Chemical Analysis, M. Vanderlaan, L. H. Stanker, B. E. Watkins, D. W. Roberts (Eds.), pp. 59-77, ACS, Washington 1991.
- [206] A. D. LUCAS, P. SCHNEIDER, R. O. HARRISON, J. N. SEIBER, B. D. HAMMOCK, J. W. BIGGAR, D. E. ROLSTON: *Determination of Atrazine and Simazine in Water and Soil Using Polyclonal and Monoclonal Antibodies in Enzyme-linked Immunosorbent Assays*, Food & Agric. Immunology **3** (1991) 155-167.
- [207] P. SCHNEIDER, B. D. HAMMOCK: *Influence of the ELISA Format and the Hapten-enzyme Conjugate on the Sensitivity of an Immunoassay for s-Triazine Herbicides Using Monoclonal Antibodies*, J. Agric. Food Chem. **40** (1992) 525-530.
- [208] F. M. RUBIO, J. A. ITAK, A. M. SCUTELLARO, M. Y. SELISKER, D. P. HERZOG: *Performance Characteristics of a Novel Magnetic-particle-based Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Quantitative Analysis of Atrazine and Related Triazines in Water Samples*, Food & Agric. Immunology **3** (1991) 113-125.
- [209] J. R. FLEEKER, L. W. COOK: *Reliability of Commercial Enzyme Immunoassay in Detection of Atrazine in Water*, in: Immunochemical Methods in Environmental Analysis, pp. 78-85, ACS Symp. Ser. 442, J. M. Van Emon, R. O. Mumma (Eds.), ACS, Washington, DC 1990.
- [210] D. A. GOOLSBY, E. M. THURMAN, M. L. CLARK, M. L. POMES: *Immunoassay as a Screening Tool for Triazine Herbicides in Streams - Comparison with Gas Chromatographic-mass Spectrometric Methods*, in: Immunochemical Methods in Environmental Analysis, pp. 86-99, ACS Symp. Ser. 442, J. M. Van Emon, R. O. Mumma (Eds.), ACS, Washington, DC 1990.
- [211] B. HOCK: *Enzyme Immunoassays for the Determination of s-Triazines in Water Samples: Two Interlaboratory Tests*, Anal. Lett. **24** (1991) 529-549.
- [212] L. WEIL, W. D. HÖRMANN: *Atrazinbestimmung im Wasser*, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. **3** (1991) 306-309.
- [213] W. DESSAU, B. KNABE, W. POPP, H.-J. HOFFMANN: *Immunoassays in der Wasseranalytik*, BioTec Oktober (1989) 31-33.
- [214] S. A. LEVISON, A. J. PORTMANN, F. KIERSZENBAUM, W. B. DANDLIKER: *Kinetic Behaviour of Antihapten Antibody of Restricted Heterogeneity by Stopped Flow Fluorescence Polarization Kinetics*, Biochem. Biophys. Res. Comm. **43** (1971) 258-266.
- [215] R. CHEN, L. WENG, N. C. SIZTO, B. OSORIO, C.-J. HSU, R. RODGERS, D. J. LITMAN: *Ultrasound-accelerated Immunoassay, as Exemplified by Enzyme Immunoassay of Choriogonadotropin*, Clin. Chem. **30** (1984) 1446-1451.

- [216] I. M. KLOTZ: *Ligand-protein Binding Affinities*, in: Protein Function - a Practical Approach, pp. 25-54, T. E. Creighton (Ed.), IRL, Oxford 1989.
- [217] G. SCATCHARD: *The Attraction of Proteins for Small Molecules and Ions*, Ann. N. Y. Acad. Sci. **51** (1949) 573-672.
- [218] E. EZAN, C. TIBERGHEN, F. DRAY: *Practical Method for Optimizing Radioimmunoassay Detection and Precision Limits*, Clin. Chem. **37** (1991) 226-230.
- [219] P. TIJSSEN: *Kinetics and Nature of Antibody-antigen Interactions*, in: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds.), p. 123-149, Elsevier, Amsterdam 1985.
- [220] A. L. LEHNINGER: Biochemie, S. 155, 2. Aufl., VCH, Weinheim 1985.
- [221] V. VAN HEYNINGEN, D. J. H. BROCK, S. VAN HEYNINGEN: *A Simple Method for Ranking the Affinities of Monoclonal Antibodies*, J. Immunol. Meth. **62** (1983) 147-153.
- [222] G. C. CHAMNESS, W. L. MCGUIRE: *Scatchard Plots: Common Errors in Correction and Interpretation*, Steroids **26** (1975) 538-542.
- [223] J. G. RATCLIFFE: *Separation Techniques in Saturation Analysis*, Brit. Med. Bull. **30** (1974) 32-37.
- [224] I. J. K. SEPPÄLÄ: *Disturbance of Hapten-antibody Equilibria by Ammonium Sulphate Solutions. A Source of Error in Antibody Affinity Determinations*, J. Immunol. Meth. **9** (1975) 135-140.
- [225] MEDOR GmbH: Biochemicals Catalog 1991, pp. 91-107, 8036 Herrsching.
- [226] R. MÜLLER: *Calculation of Average Antibody Affinity in Anti-hapten Sera from Data Obtained by Competitive Radioimmunoassay*, J. Immunol. Meth. **34** (1980) 345-352.
- [227] B. FRIGUET, A. F. CHAFFOTTE, L. DJAVADI-OHANIAN, M. E. GOLDBERG: *Measurement of the True Affinity Constant in Solution of Antigen-antibody Complexes by Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, J. Immunol. Meth. **77** (1985) 305-319.
- [228] F. J. STEVENS: *Modifications of an ELISA-based Procedure for Affinity Determination: Correction Necessary for Use with Bivalent Antibody*, Mol. Immunol. **24** (1987) 1055-1060.
- [229] P. J. HOGG, S. C. JOHNSTON, M. R. BOWLES, S. M. POND, D. J. WINZOR: *Evaluation of Equilibrium Constants for Antigen-antibody Interactions by Solid-phase Immunoassay: The Binding of Paraquat to its Elicited Mouse Monoclonal Antibody*, Mol. Immunol. **24** (1987) 797-801.

- 
- [230] A. NIETO, A. GAYA, M. JANSA, C. MORENO, J. VIVES: *Direct Measurement of Antibody Affinity Distribution by Hapten-inhibition Enzyme-immunoassay*, Mol. Immunol. **21** (1984) 537-543.
- [231] E. W. WEILER: *Immunoassay for the Quantitation of Low Molecular Weight Compounds in Plants*, in: Chemistry of Plant Protection, Vol. 3, pp. 151-155, Springer, Berlin 1989.
- [232] P. N. NAYAK: *The Kinetics of Solid-phase Immunoassays*, Ligand Quarterly **4/1** (1981) 34-42.
- [233] M. STENBERG, H. NYGREN: *A Diffusion Limited Reaction Theory for a Solid-phase Immunoassay*, J. Theor. Biol. **113** (1985) 589-597.
- [234] M. STENBERG, H. NYGREN: *Kinetics of Antigen-antibody Reactions at Solid-liquid Interfaces*, J. Immunol. Meth. **113** (1988) 3-15.
- [235] M. STENBERG, L. STIBLERT: *External Diffusion in Solid-phase Immunoassays*, J. Theor. Biol. **120** (1986) 129-140.
- [236] R. F. VOGT, JR., D. L. PHILLIPS, L. O. HENDERSON, W. WHITFIELD, F. W. SPIERTO: *Quantitative Differences Among Various Proteins as Blocking Agents for ELISA Microtiter Plates*, J. Immunol. Meth. **101** (1987) 43-50.
- [237] R. P. PRATT, B. ROSER: *Comparison of Blocking Agents for ELISA*, Nunc Bulletin No. 7, Dec 89, Roskilde (Dänemark) 1989.
- [238] M. WELLER: *Chemische und physikalische Einflüsse auf die Triazin-Bestimmung im Wasser mittels Enzymimmunoassay*, Diplomarbeit, Fakultät Chemie, Biologie und Geowissenschaften der Technischen Universität München, 1989.
- [239] P. ESSER: *Negative Edge Effect in Microwell ELISA*, Nunc Bulletin No. 4, June 87, Roskilde (Dänemark) 1987.
- [240] P. ESSER: *Edge Effect in Microwell ELISA*, Nunc Bulletin No. 1, Oct 85, Roskilde (Dänemark) 1985.
- [241] R. J. SCHNEIDER: *Persönliche Mitteilung*, Institut für Wasserchemie, Technische Universität München 1992.
- [242] P. M. KEANE, W. H. C. WALKER, J. GAULDIE, G. E. ABRAHAM: *Thermodynamic Aspects of Some Radioassays*, Clin. Chem. **22** (1976) 70-73.
- [243] M. GROHL, M. SCHULZE: *Immunoassays für lösliche Antigene: Ein Überblick*, in: Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung, 2. Aufl., J.H. Peters, H. Baumgarten (Eds.), S. 327-328, Springer, Berlin 1988.

- [244] T. CHARD: *Requirements for Binding Assays - Tracer Using Radioisotopic Labels, An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds.), pp. 53-54, Elsevier, Amsterdam 1987.
- [245] L. G. BACHAS, P. F. LEWIS, M. E. MEYERHOFF: *Cooperative Interaction of Immobilized Folate Binding Protein with Enzyme-folate Conjugates: An Enzyme-linked Assay for Folate*, Anal. Chem. **56** (1984) 1723-1726.
- [246] F. JUNG, S. J. GEE, R. O. HARRISON, M. H. GOODROW, A. E. KARU, A. L. BRAUN, Q. X. LI, B. D. HAMMOCK: *Use of Immunological Techniques for the Analysis of Pesticides*, Pestic. Sci. **26** (1989) 303-317.
- [247] M. J. SAUER, J. A. FOULKES, P. M. O'NEILL: *The Influence of Heterology, Enzyme Label and Assay Conditions on the Sensitivity of Microtitre Plate Enzymeimmunoassays for Progesterone in Milk*, J. Steroid Biochem. **33** (1989) 433-438.
- [248] B. K. VAN WEEMEN, A. H. W. M. SCHUURS: *The Influence of Heterologous Combinations of Antiserum and Enzyme-labeled Estrogen on the Characteristics of Estrogen Enzyme-immunoassays*, Immunochemistry **12** (1975) 667-670.
- [249] G. D. NORDBLOM, R. E. COUNSELL, B. G. ENGLAND: *A Specific Radioimmunoassay for Androstenedione with Reduced Bridge-binding*, Steroids **44** (1984) 275-282.
- [250] R. M. ALLEN, M. R. REDSHAW: *The Use of Homologous and Heterologous <sup>125</sup>I-Radio-ligands in the Radioimmunoassay of Progesterone*, Steroids **32** (1978) 467-468.
- [251] M. MITSUMA, A. KAMBEGAWA, S. OKINAGA, K. ARAI: *A Sensitive Bridge Heterologous Enzyme Immunoassay of Progesterone Using Geometrical Isomers*, J. Steroid Biochem. **28** (1987) 83-88.
- [252] M. J. RASSAIE, G. L. KUMARI, P. N. RAO, T. G. SHRIVASTAV, H. P. PANDEY: *Influence of Different Combinations of Antibodies and Penicillinase-labeled Testosterone Derivatives on Sensitivity and Specificity of Immunoassays*, Steroids **57** (1992) 112-118.
- [253] B. PELC, A. L. HOLMES: *Potential [<sup>125</sup>I]-Iodinated Tracers for the Radioimmunoassay of Dehydroepiandrosterone*, J. Steroid Biochem. **14** (1981) 1201-1207.
- [254] E. H. D. CAMERON, J. J. SCARISBRICK, S. E. MORRIS, S. G. HILLIER, G. READ: *Some Aspects of the Use of <sup>125</sup>I-Labelled Ligands for Steroid Radioimmunoassay*, J. Steroid Biochem. **5** (1974) 749-756.
- [255] E. KUSS: *Discussion*, in: J. Steroid Biochem. **5** (1974) 755.

- [256] K. FUJIWARA, S. ONO, H. FUJINAKA, T. KITAGAWA: *Heterologous Enzyme Immunoassay for Puromycin Aminonucleoside Using  $\beta$ -D-Galactosidase as a Label*, J. Immunol. Meth. **72** (1984) 109-118.
- [257] U. PIRAN, W. J. RIORDAN, D. R. SILBERT: *Effects of Hapten Heterology on Thyroid Hormone Immunoassays*, J. Immunol. Meth. **133** (1990) 207-214.
- [258] J. E. T. CORRIE, W. M. HUNTER, J. S. MACPHERSON: *A Strategy for Radioimmunoassay of Plasma Progesterone with Use of a Homologous-site  $^{125}$ I-Labeled Radioligand*, Clin. Chem. **27** (1981) 594-599.
- [259] L. X. TIEFENAUER, R. Y. ANDRES: *Prevention of Bridge Binding Effects in Haptenic Immunoassay Systems Exemplified by an Iodinated Radioimmunoassay for Melatonin*, J. Immunol. Meth. **74** (1984) 293-298.
- [260] L. X. TIEFENAUER, D. M. BODMER, W. FREI, R. Y. ANDRES: *Prevention of Bridge Binding in Immunoassays: A General Estradiol Tracer Structure*, J. Steroid Biochem. **32** (1989) 251-257.
- [261] R. L. WILDER, G. GREEN, V. N. SCHUMAKER: *Bivalent Hapten-antibody Interactions - I. A Comparison of Water Soluble and Water Insoluble Bivalent Haptens*, Immunochemistry **12** (1975) 39-47.
- [262] C. R. LOWE: Affinity Chromatography, pp. 218-220, Wiley & Sons, 1974.
- [263] D. L. COLBERT, S. A. EREMIN, J. LANDON: *The Effect of Fluorescein Labels on the Affinity of Antisera to Small Haptens*, J. Immunol. Meth. **140** (1991) 227-233.
- [264] L. X. TIEFENAUER, R. Y. ANDRES: *Biotinyl-estradiol Derivatives in Enzyme Immunoassays: Structural Requirements for Optimal Antibody Binding*, J. Steroid Biochem. **35** (1990) 633-639.
- [265] H. HOSODA, N. KOBAYASHI, N. ISHII, T. NAMBARA: *Bridging Phenomena in Steroid Immunoassays. The Effect of Bridge Length on Sensitivity in Enzyme Immunoassay*, Chem. Pharm. Bull. **34** (1986) 2105-2111.
- [266] G. D. NORDBLOM, R. E. COUNSELL, B. G. ENGLAND: *Ligand Specificity and Bridging Phenomena in Hapten Radioimmunoassays*, Ligand Rev. **2** (1979) 34-36.
- [267] C. KEUCHEL, L. WEIL, R. NIESSNER: *Effect of the Variation of the Length of the Spacer in a Competitive Enzyme Immunoassay (ELISA) for the Determination of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT)*, Fresenius J. Anal. Chem. **343** (1992) 143.
- [268] J. A. BERMÚDEZ, V. CORONADO, A. MIJARES, C. LEÓN, A. VELÁZQUEZ, P. NOBLE, J. L. MATEOS: *Stereochemical Approach to Increase the Specificity of Steroid Antibodies*, J. Steroid Biochem. **6** (1975) 283-290.



- [269] S. BAUMINGER, F. KOHEN, H. R. LINDNER: *Steroids as Haptens: Optimal Design of Antigens for the Formation of Antibodies to Steroid Hormones*, J. Steroid Biochemistry **5** (1974) 739-747.
- [270] E. KUSS, R. GOEBEL, H. ENDERLE: *Influence of Oxo-, and/or Hydroxy-groups at C-16/C-17 of Estrogens on Affinity to Anti-estrone, Anti-estradiol-17 $\alpha$ - and Anti-estradiol-17 $\beta$ -antisera*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **354** (1973) 347-364.
- [271] P. K. GROVER, W. D. ODELL: *Specificity of Antisera to Sex Steroids I - The Effect of Substitution and Stereochemistry*, J. Steroid Biochem. **8** (1977) 121-126.
- [272] E. W. WEILER, U. WIECZOREK: *Determination of Femtomol Quantities of Gibberellic Acid by Radioimmunoassay*, Planta **152** (1981) 159-167.
- [273] E. W. WEILER: *Radioimmunoassay for the Determination of Free and Conjugated Abscisic Acid*, Planta **144** (1979) 255-263.
- [274] D. KNOPP, P. NUHN, H.-J. DOBBERKAU: *Radioimmunoassay for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid*, Arch. Toxicol. **58** (1985) 27-32.
- [275] G. MATUSZCZYK: *Persönliche Mitteilung*, Institut für Wasserchemie, Technische Universität München 1992.
- [276] F. SZURDOKI, H. K. M. BEKHEIT, M.-P. MARCO, M. H. GOODROW, AND B. D. HAMMOCK: *Synthesis of Haptens and Conjugates for an Enzyme Immunoassay for Analysis of the Herbicide Bromacil*, J. Agric. Food Chem. **40** (1992) 1459-1465.
- [277] R. P. VALLEJO, E. R. BOGUS, R. O. MUMMA: *Effects of Hapten Structure and Bridging Groups on Antisera Specificity in Parathion Immunoassay Development*, J. Agric. Food Chem. **30** (1982) 572-580.
- [278] K. LANDSTEINER: *Die serologische Spezifität der Proteine, Die Spezifität der serologischen Reaktionen*, S. 26, Springer, Berlin 1933.
- [279] S. J. GEE, R. O. HARRISON, M. H. GOODROW, A. L. BRAUN, B. D. HAMMOCK: *Development of Immunoassays for Thiocarbamate Herbicides*, in: Immunoassays for Trace Chemical Analysis, M. Vanderlaan, L. H. Stanker, B. E. Watkins, D. W. Roberts (Eds.), pp. 100-107, ACS, Washington 1990.
- [280] S. J. GEE, T. MIYAMOTO, M. H. GOODROW, D. BUSTER, B. D. HAMMOCK: *Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Analysis of the Thiocarbamate Herbicide Molinate*, J. Agric. Food Chem. **36** (1988) 863-870.
- [281] R. O. HARRISON, M. H. GOODROW, S. J. GEE, B. D. HAMMOCK: *Hapten Synthesis for Pesticide Immunoassay Development*, in: Immunoassays for Trace Chemical Analysis, M. Vanderlaan, L. H. Stanker, B. E. Watkins, D. W. Roberts (Eds.), pp. 14-27, ACS, Washington 1991.

- [282] P. TIJSSEN: *Introduction*, in: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds.), pp. 1-7, Elsevier, Amsterdam 1985.
- [283] D. RODBARD: *Statistical Estimation of the Minimal Detectable Concentration ("Sensitivity") for Radioligand Assays*, Anal. Biochem. **90** (1978) 1-12.
- [284] S. EBEL, K. KAMM: *Statistische Definition der Bestimmungsgrenze*, Fresenius Z. Anal. Chem. **316** (1983) 382-385.
- [285] M. G. WELLER, L. WEIL, R. NIESSNER: *Increased Sensitivity of an Enzyme Immunoassay (ELISA) for the Determination of Triazine Herbicides by Variation of Tracer Incubation Time*, Mikrochim. Acta **108** (1992) 29-40.
- [286] W. A. SADLER, M. H. SMITH: *Use and Abuse of Imprecision Profiles: Some Pitfalls Illustrated by Computed and Plotting Confidence Intervals*, Clin. Chem. **36** (1990) 1346-1350.
- [287] M. W. STEWARD, A. M. LEW: *The Importance of Antibody in the Performance of Immunoassays for Antibody*, J. Immunol. Meth. **78** (1985) 173-190.
- [288] R. EKINS, F. CHU, E. BIGGART: *Development of Microspot Multi-analyte Ratiometric Immunoassay Using Dual Fluorescent-labelled Antibodies*, Anal. Chim. Acta **227** (1989) 73-96.
- [289] J. W. FREYTAG, J. C. DICKINSON, S. Y. TSENG: *A Highly Sensitive Affinity-column-mediated Immunometric Assay, as Exemplified by Digoxin*, Clin. Chem. **30** (1984) 417-420.
- [290] C. N. HALES, P. J. RANDLE: *Immunoassay of Insulin with Insulin-antibody Precipitate*, Biochem. J. **88** (1963) 137-146.
- [291] E. SALMOLS, D. BILKUS: *A Comparison of Insulin Immunoassays*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **115** (1964) 79-84.
- [292] *ABICAP - Die neue Methode in der Immunanalytik*, ABION, Benediktbeuern 1992.
- [293] M. BÖCHER, T. GIERSCH, R. D. SCHMID: *Dextran, a Hapten Carrier in Immunoassays for s-Triazines - a Comparison with ELISAs Based on Hapten-protein Conjugates*, J. Immunol. Meth. **151** (1992) 1-8.
- [294] D. CATTY, C. RAYKUNDALIA: *ELISA and Related Enzyme Immunoassays*, in: Antibodies, Vol. II, p. 121, D. Catty (Ed.), IRL, Oxford 1989.
- [295] S. AVRAMEAS: *Amplification Systems in Immunoenzymatic Techniques*, J. Immunol. Meth. **150** (1992) 23-32.
- [296] A. PARAF, G. PELTRE: Immunoassays in Food and Agriculture, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1991.

- [297] A. FARJAM, J. J. VREULS, W. J. G. M. CUPPEN, U. A. T. BRINKMAN, G. J. DE JONG: *Direct Introduction of Large-volume Urine Samples into an On-line Immunoaffinity Sample Pretreatment - Capillary Gas Chromatography Systems*, Anal. Chem. **63** (1991) 2481-2487.
- [298] G. E. ABRAHAM: *Solid-phase Radioimmunoassay of Estradiol-17 $\beta$* , J. Clin. Endocrinol. Metab. **29** (1969) 866-870.
- [299] J. A. BERZOFKY, A. N. SCHECHTER: *The Concepts of Crossreactivity and Specificity in Immunology*, Mol. Immunol. **18** (1981) 751-763.
- [300] S. DE LAUZON, N. CITTANOVA, B. DESFOSSÉS, M. F. JAYLE: *A New Approach for Quantitative Evaluation of Cross-reactivity of Steroids with an Antiserum by Radioimmunoassay: Application to a Highly Specific Antiestriol*, Steroids **22** (1973) 747-761.
- [301] S. DE LAUZON, N. CITTANOVA, B. DESFOSSÉS, M. F. JAYLE: *CR(1 ng), a New Approach for Quantitative Evaluation of Crossreactivity of Steroids with an Antiserum in Radioimmunoassay*, in: Radioimmunoassay of Steroid Hormones, D. Gupta (Ed.), pp. 55-61, Verlag Chemie, Weinheim 1975.
- [302] P. ULRICH, M. WELLER, L. WEIL, R. NIEßNER: *Optimierung der immunologischen Bestimmung von Triazin-Herbiziden im Wasser mit Hilfe unterschiedlicher Enzymtracer*, Vom Wasser **76** (1991) 251-266.
- [303] C. KEUCHEL, L. WEIL, R. NIEßNER: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Determination of 2,4,6-Trinitrotoluene and Related Nitroaromatic Compounds*, Anal. Sci. **8** (1992) 9-12.
- [304] K. MEISENECKER: *Entwicklung eines Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay für die Stoffklasse der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe am Beispiel des Pyrens*, Diplomarbeit, Fakultät Chemie, Biologie und Geowissenschaften der Technischen Universität München, 1992.
- [305] D. E. H. LLEWELYN, S. G. HILLIER, G. F. READ: *The Use of Multivariable Standard Curves in the Radioimmunoassay of Testosterone and 5- $\alpha$ -Dihydrotestosterone*, Steroids **29** (1977) 417-426.
- [306] J. J. MILLER, R. VALDES, JR.: *Methods for Calculating Crossreactivity in Immunoassays*, J. Clin. Immunoassay **15** (1992) 97-107.
- [307] C. KEUCHEL, L. WEIL, R. NIEßNER: *Development of an Enzyme Immunoassay for the Determination of 2,4,6-Trinitrotoluene - Probing the Influence of Humic Acids*, EOS/SPIE Proceedings, The International Society for Optical Engineering, Bellingham 1992, in press.
- [308] M. FRÁNEK: *Structural Aspects of Steroid-antibody Specificity*, J. Steroid Biochem. **28** (1987) 95-108.

- [309] B. BOUTTEN, E. EZAN, S. MAMAS, F. DRAY: *Elimination of Undesired Cross-reactants by Using Mixtures of Antibodies: Experimental and Theoretical Evaluations of Hapten Radioimmunoassays*, Clin. Chem. **37** (1991) 394-397.
- [310] R. J. SCHNEIDER, L. WEIL, R. NIESSNER: *Identification of Two Triazine Herbicides in Top Soil Layers Using Immunoassays of Different Selectivity*, Fresenius J. Anal. Chem. **343** (1992) 145-146.
- [311] G. E. ROVATI, D. RODBARD, P. J. MUNSON: *DESIGN: Computerized Optimization of Experimental Design for Estimating  $K_d$  and  $B_{max}$  in Ligand Binding Experiments, I. Homologous and Heterologous Binding to One or Two Classes of Sites*, Anal. Biochem. **174** (1988) 636-649.
- [312] G. E. ROVATI, D. RODBARD, P. J. MUNSON: *DESIGN: Computerized Optimization of Experimental Design for Estimating  $K_d$  and  $B_{max}$  in Ligand Binding Experiments, II. Simultaneous Analysis of Homologous and Heterologous Competition Curves and Analysis of Blocking and of "Multiligand" Dose-response Surfaces*, Anal. Biochem. **184** (1980) 172-183.
- [313] K. R. BLOMBERG, S. O. ENGBLOM: *Mathematical Theory of Complex Ligand-binding Systems Applied to Free Triiodothyronine Immunoassays*, Anal. Chem. **63** (1991) 2581-2586.
- [314] R. A. MCPHERSON, A. ZETTNER: *A Mathematical Analysis of the Incubation Time in Competitive Binding Systems*, Anal. Biochem. **64** (1975) 501-508.
- [315] V. CHAPMAN, S. M. FLETCHER, M. N. JONES: *A Simple Theoretical Treatment of a Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and its Application to the Detection of Human Blood Group Antigens*, J. Immunol. Meth. **131** (1990) 91-98.
- [316] C. J. HALFMAN: *Concentrations of Binding Protein and Labeled Analyte for Optimizing the Response in Immunoassays*, Anal. Chem. **51** (1979) 2306-2311.
- [317] C. J. HALFMAN, A. S. SCHNEIDER: *Optimization of Reactant Concentrations for Maximizing Sensitivities of Competitive Immunoassays*, Anal. Chem. **53** (1981) 654-658.
- [318] M. YANAGISHITA, D. RODBARD: *Computerized Optimization of Radioimmunoassays for hCG and Estradiol: An Experimental Evaluation*, Anal. Biochem. **88** (1978) 1-19.
- [319] W. R. GRISWOLD: *Theoretical Analysis of the Sensitivity of the Solid Phase Antibody Assay (ELISA)*, Mol. Immunol. **24** (1987) 1291-1294.
- [320] W. SHAW, I. L. HUBERT, S. T. AGNESE, F. W. SPIERTO: *Optimization of  $T_4$  Assay: a Model Study*, Clin. Chim. Acta **72** (1976) 69-82.
- [321] W. H. PRESS, B. P. FLANNERY, S. A. TEUKOLSKY, W. T. VETTERLING: Numerical Recipes in Pascal - The Art of Scientific Computing, pp. 309-350, Cambridge University Press, Cambridge 1989.

- [322] P. C. C. FENG, S. R. HORTON, C. R. SHARP: *A General Method for Developing Immunoassays to Chloroacetanilide Herbicides*, J. Agric. Food Chem. **40** (1992) 211-214.
- [323] A. KREUTZBERGER: *Die Chemie des s-Triazins*, Fortschr. chem. Forsch. **4** (1963) 273-300.
- [324] H. GYSIN, E. KNÜSLI: *Chemistry and Herbicidal Properties of Triazine Derivatives*, in: Advances in Pest Control Research, Vol. III, R.L. Metcalf (Ed.), pp. 289-358.
- [325] W. SCHWARZE, H.-P. KRIMMER, K. DRAUZ: *Chemie des Cyanurchlorids*, in: "Stets geforscht...", Chemieforschung im Degussa-Forschungszentrum Wolfgang, Bd. 2, S. 41-51, Degussa AG, Frankfurt am Main 1988.
- [326] W. WEIGERT, G. DÜSING, N. KRIEBITZSCH, H. PFLEGER: *Cyansäure und Cyanursäure*, in: Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, 4. Aufl., Bd. 9, S. 647-653, Verlag Chemie, Weinheim 1975.
- [327] E. FORCHE: *Reaktivität und Umwandlungen von Fluorverbindungen*, in: Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), Band V/3, E. Müller (Hrsg.), S. 416-417, Thieme, Stuttgart 1962.
- [328] H.-F. PIEPENBRINK: *Trimere Kohlendioxid-derivate*, in: Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl), Band VIII, E. Müller (Hrsg.), S. 228-243, Thieme, Stuttgart 1952.
- [329] J. T. THURSTON, J. R. DUDLEY, D. W. KAISER, I. HECHENBLEIKNER, F. C. SCHAEFER, D. HOLM-HANSEN: *Cyanuric Chloride Derivatives. I. Aminochloro-s-triazines*, J. Amer. Chem. Soc. **73** (1951) 2981-2983.
- [330] D. W. KAISER, J. T. THURSTON, J. R. DUDLEY, F. C. SCHAEFER, I. HECHENBLEIKNER, D. HOLM-HANSEN: *Cyanuric Chloride Derivatives. II. Substituted Melamines*, J. Amer. Chem. Soc. **73** (1951) 2984-2986.
- [331] J. R. DUDLEY, J. T. THURSTON, F. C. SCHAEFER, D. HOLM-HANSEN, C. J. HULL, P. ADAMS: *Cyanuric Chloride Derivatives. III. Alkoxy-s-triazines*, J. Amer. Chem. Soc. **73** (1951) 2986-2990.
- [332] F. C. SCHAEFER, J. T. THURSTON, J. R. DUDLEY: *Cyanuric Chloride Derivatives. IV. Aryloxy-s-triazines*, J. Amer. Chem. Soc. **73** (1951) 2990-2992.
- [333] J. R. CAMPBELL, R. E. HATTON: *Unsymmetrically Substituted Melamines*, J. Org. Chem. **26** (1961) 2786-2789.
- [334] DEGUSSA: *Arbeitsvorschrift für die Herstellung von Ametryn (2-Methylmercapto-4-i-propylamino-6-äthylamino-s-triazin) in wässriger Suspension*, Geschäftsbereich Industrie- und Feinchemikalien (Anwendungstechnik), Hanau 1990.

- [335] P. RYS, A. SCHMITZ, H. ZOLLINGER: *Der Mechanismus der Hydrolyse von Chlor-triazinen in protischen Lösungsmitteln*, Helv. Chim. Acta **54** (1971) 163-176.
- [336] G. W. ANDERSON, J. E. ZIMMERMAN, F. M. CALLAHAN: *The Use of N-Hydroxy-succinimide in Peptide Synthesis*, J. Amer. Chem. Soc. **86** (1964) 1839-1842.
- [337] M. BODANSZKY, A. BODANSZKY: The Practice of Peptide Synthesis, S. 125, Springer, Berlin 1984.
- [338] P. ULRICH, L. WEIL, R. NIESSNER: *Rapid Fluorescence Immunoassay (FIA) for the Determination of Terbutylazine*, Fresenius J. Anal. Chem. **343** (1992) 50-51.
- [339] P. ULRICH: *Persönliche Mitteilung*, Institut für Wasserchemie, Technische Universität München 1992.
- [340] C. KEUCHEL: *Persönliche Mitteilung*, Institut für Wasserchemie, Technische Universität München 1992.
- [341] M. J. SAUER, B. A. MORRIS: *A Simple Procedure for Enzyme Labelling of Progesterone Derivatives: Application of Active Esters Formed Using N,N'-Disuccinimidyl Carbonate*, J. Steroid Biochem. **26** (1987) 165-167.
- [342] K. TAKEDA, H. OGURA: *Studies on Heterocyclic Compounds. XLIII Insertion Reaction of Carbonyl Group Using Disuccinimido Carbonate (DSC)*, Synthetic Communications **12** (1982) 213-217.
- [343] H. OGURA, T. KOBAYASHI, K. SHIMIZU, K. KAWABE, K. TAKEDA: *A Novel Active Ester Synthesis Reagent (N,N'-Disuccinimidyl Carbonate)*, Tetrahed. Lett. **49** (1979) 4745-4746.
- [344] J. V. STAROS: *N-Hydroxysulfosuccinimide Active Esters: Bis(N-hydroxysulfosuccinimide) Esters of Two Dicarboxylic Acids Are Hydrophilic, Membrane-impermeant, Protein Cross-linkers*, Biochemistry **21** (1982) 3950-3955.
- [345] P. K. NAKANE, A. KAWAOI: *Peroxidase-labeled Antibody - A New Method of Conjugation*, J. Histochem. Cytochem. **22** (1974) 1084-1091.
- [346] H. BEYER, W. WALTER: Lehrbuch der Organischen Chemie, 21. Aufl., S. 303, Hirzel, Stuttgart 1988.
- [347] M. WILCHEK, E. A. BAYER: *Labeling Glycoconjugates with Hydrazide Reagents*, Methods in Enzymology **138** (1987) 429-442.
- [348] D. J. O'SHANNESY, R. H. QUARLES: *Labeling of the Oligosaccharide Moieties of Immunoglobulins*, J. Immunol. Meth. **99** (1987) 153-161.
- [349] H. HAMBOECK, R. W. FISCHER, E. E. DI IORIO, K. H. WINTERHALTER: *The Binding of s-Triazine Metabolites to Rodent Hemoglobins Appears Irrelevant to Other Species*, Molecular Pharmacology **20** (1981) 579-584.

- [350] J. R. BROWN: *Structure and Evolution of Serum Albumin*, in: Albumin - Structure, Biosynthesis, Function, pp. 1-10, FEBS 11th Meeting Copenhagen, Vol. 50, T. Peters, I. Sjöholm (Eds.), Pergamon, Oxford 1977.
- [351] G. E. MEANS, R. E. FEENEY: *Chemical Modifications of Proteins: History and Applications*, Bioconjugate Chem. 1 (1990) 2-12.
- [352] M. BRINKLEY: *A Brief Survey of Methods for Preparing Protein Conjugates with Dyes, Haptens, and Cross-linking Reagents*, Bioconjugate Chem. 3 (1992) 2-13.
- [353] B. F. ERLANGER: *The Preparation of Antigenic Hapten-carrier Conjugates: A Survey*, Methods in Enzymology 70 (1980) 85-104.
- [354] A. N. GLAZER, R. J. DELANGE, D. S. SIGMAN: Chemical Modification of Proteins: Selected Methods and Analytical Procedures, T. S. Work, E. Work (Eds.), Elsevier, Amsterdam 1975.
- [355] S. MULLER: *Peptide-carrier Conjugation*, in: Synthetic Polypeptides as Antigens, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds.), pp. 95-130, Elsevier, Amsterdam 1988.
- [356] C. KEUCHEL: *Persönliche Mitteilung*, Institut für Wasserchemie, Technische Universität München, 1992.
- [357] T. CHARD: *Requirements for Binding Assays - Purified Ligand*, An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds.), pp. 26-39, Elsevier, Amsterdam 1987.
- [358] R. J. SCHNEIDER, T. RUPPERT, M. WELLER, L. WEIL, R. NIESSNER: *Comparison of Results Obtained from Enzyme Immunoassay and Gas Chromatography in the Determination of Some Herbicide Residues in Both Water and Soil*, Fresenius J. Anal. Chem. 337 (1990) 74-75.
- [359] T. RUPPERT, L. WEIL, R. NIESSNER: *Influence of Water Contents on an Enzyme Immunoassay for Triazine Herbicides*, Vom Wasser 78 (1992) 387-401.
- [360] U. OEHMICHEN, F. KARRENBROCK, K. HABERER: *Determination of N-Pesticides in Natural Waters*, Fresenius Z. Anal. Chem. 327 (1987) 715-719.
- [361] M. GRANDET, L. WEIL, K.-E. QUENTIN: *Gaschromatographische Bestimmung der Triazin-Herbizide und ihrer Metabolite im Wasser*, Z. Wasser- Abwasser-Forsch. 21 (1988) 21-24.
- [362] L. FISHBEIN: *Chromatography of Triazines*, Chromatographic Reviews 12 (1970) 167-238.
- [363] A. CEE, J. GASPARIC: *Identification of Organic Compounds LXXV. Paper and Thin-layer Chromatography of Simple s-Triazine Derivatives*, J. Chromatogr. 56 (1971) 342-344.

- [364] R. W. FREI, N. S. NOMURA, M. M. FRODYMA: *A Comparison of New Techniques for the Detection and Determination of Triazine Herbicides, Separated by Thin-layer Chromatography*, Mikrochim. Acta **6** (1967) 1099-1103.
- [365] R. W. FREI, C. D. FREEMANN: *A Comparison of New Techniques for the Detection and Determination of Triazine Herbicides, Separated by Thin-layer Chromatography III*, Mikrochim. Acta **6** (1968) 1214-1223.
- [366] H. JORK, B. ROTH: *Vergleichende chromatographische Untersuchungen bei s-Triazinen*, J. Chromatogr. **144** (1977) 39-56.
- [367] D. P. SCHWARTZ, R. S. BRIGHT: *A Column Procedure for the Esterification of Organic Acids with Diazomethane at the Microgram Level*, Anal. Biochem. **61** (1974) 271-274.
- [368] *Introduction to Derivatization*, Chrompack News Special 82-04, pp. 1-8, Chrompack (Niederlande), Middelburg 1982.
- [369] M. HOLLECKER: *Counting Integral Numbers of Residues by Chemical Modification*, in: Protein Structure - A Practical Approach, pp. 145-153, T. E. Creighton (Ed.), IRL, Oxford 1989.
- [370] H. SCHÖFFL, R. SCHULTE-HERMANN, H. A. TRITTHART (Hrsg.): Grenzen und Möglichkeiten der Reduktion von Tierversuchen, Springer, Wien 1992.
- [371] C. WITTMANN: *Entwicklung und Anwendung eines Enzymimmunoassays zur quantitativen Bestimmung von Atrazin und der Atrazin-Metaboliten Desethylatrazin, Desisopropylatrazin und Hydroxyatrazin*, Dissertation, Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau der Technischen Universität München, München-Weihenstephan 1991.
- [372] D. A. TOMALIA, A. M. NAYLOR, W. A. GODDARD III: *Starburst-Dendrimere: Kontrolle von Größe, Gestalt, Oberflächenchemie, Topologie und Flexibilität beim Übergang von Atomen zu makroskopischer Materie*, Angew. Chem. **102** (1990) 119-157.
- [373] H. BAUMGARTEN: *Beeinflussung der Immunantwort*, in: Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung, 2. Aufl., J.H. Peters, H. Baumgarten (Eds.), S. 58-70, Springer, Berlin 1988.
- [374] O. LOCKHOFF: *Glycolipide als Immunmodulatoren - Synthesen und Eigenschaften*, Angew. Chem. **103** (1991) 1639-1649.
- [375] G. H. WERNER: *Immunostimulants: The Western Scene*, in: Immunostimulants: Now and Tomorrow, I. Azuma, G. Jollès (Eds.), pp. 3-39, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Springer, Berlin 1987.



- [376] I. AZUMA: *Development of Immunostimulants in Japan*, in: *Immunostimulants: Now and Tomorrow*, I. Azuma, G. Jollès (Eds.), pp. 41-56, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Springer, Berlin 1987.
- [377] *Adjuvant Glycopeptide GMDP*, Informationsschrift der GERBU Trading, 6901 Gaiberg.
- [378] *ABM-Adjuvans System*, Informationsblatt, 05.90, PAN Systems, 8359 Aidenbach.
- [379] W. G. BESSLER, B. SUHR, H.-J. BÜHRING, C. P. MULLER, K.-H. WIESMÜLLER, G. BECKER, G. JUNG: *Specific Antibodies Elicited by Antigen Covalently Linked to a Synthetic Adjuvant*, Immunobiol. **170** (1985) 239-244.
- [380] W. G. BESSLER, S. HAUSCHILDT: *Bakterielle Lipopeptide als Immunadjuvantien*, forum mikrobiologie **4** (1987) 106-111.
- [381] *Antibodies and Reagents for Immunochemistry 1989*, Informationsbroschüre, S. 107, Boehringer Mannheim, 1989.
- [382] G. JUNG, K.-H. WIESMÜLLER, G. BECKER, H.-J. BÜHRING, W. G. BESSLER: *Verstärkte Produktion spezifischer Antikörper durch Präsentation der antigenen Determinanten mit kovalent verknüpften Lipopeptid-Mitogenen*, Angew. Chem. **97** (1985) 883-885.
- [383] G. GREGORIADIS: *Immunological Adjuvants: A Role for Liposomes*, Immunology Today **11** (1990) 89-97.
- [384] P. W. ATKINS: Physikalische Chemie, 1. Aufl., S. 709, VCH, Weinheim 1987.
- [385] K. J. WANNOWIUS: *Planung und Auswertung kinetischer Experimente, Teil I: Versuchsplanung*, GIT Fachz. Lab. **31** (1987) 1051-1060.
- [386] L. A. CANTARERO, J. E. BUTLER, J. W. OSBORNE: *The Adsorptive Characteristics of Proteins for Polystyrene and Their Significance in Solid-phase Immunoassays*, Anal. Biochem. **105** (1980) 375-382.
- [387] Q. VOS, E. A. KLASSEN, J. J. HAADJMAN: *The Effect of Divalent and Univalent Binding on Antibody Titration Curves in Solid-phase ELISA*, J. Immunol. Meth. **103** (1987) 47-54.
- [388] *Studies on Immobilization of Biological Materials - Adsorption of Antibodies to Polystyrene*, Informationsbroschüre, Labsystems Research Centre, Finnland 1991.
- [389] M. WERTHÉN, H. NYGREN: *Effect of Antibody Affinity on the Isotherm of Antibody Binding to Surface-immobilized Antigen*, J. Immunol. Meth. **115** (1988) 71-78.
- [390] P. ULRICH: *Persönliche Mitteilung*, Institut für Wasserchemie, Technische Universität München, 1992.

- [391] P. W. ATKINS: Physikalische Chemie, 1. Aufl., S. 712, VCH, Weinheim 1987.
- [392] T. CHARD: *The Background to Immunoassay*, An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds.), pp. 1-25, Elsevier, Amsterdam 1987.
- [393] K. LÖSTER, R. KUHL, D. JOSIC, J. REUSCH: *Detection of Different Isoforms of Monoclonal Antibodies by Hydroxylapatite HPLC*, Fresenius J. Anal. Chem. **343** (1992) 87-88.
- [394] K. LÖSTER, D. JOSIC, J. REUSCH: *Nachweis verschiedener Isoformen monoklonaler Antikörper durch Hydroxylapatit-HPLC*, GIT Spezial: Chromatographie **12** (1992) 104-106.
- [395] R. J. SCHNEIDER: *Immunologische Bestimmung von Triazinherbiziden in Boden und Wasser: Grundlagen, Verifizierung und Fehlerquellen*, Diplomarbeit, S. 55, Fakultät Chemie, Biologie und Geowissenschaften der Technischen Universität München, 1989.
- [396] H. LUX: *Praktikum der quantitativen anorganischen Analyse*, 6. Aufl., Bergmann, München 1970.
- [397] G. JANDER, K. F. JAHR, H. KNOLL: *Maßanalyse - Theorie und Praxis der klassischen und der elektrochemischen Titrierverfahren*, de Gruyter, Berlin 1973.
- [398] *Bestimmung von Wasserstoffperoxid (Hydrogenperoxid) und seinen Addukten, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*, 18. Lieferung, H15, S. 2-8, VCH, Weinheim 1987.
- [399] P. TIJSSEN: *Kinetics and Nature of Antibody-antigen Interactions*, in: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds.), p. 134 u. 299, Elsevier, Amsterdam 1985.
- [400] W. D. ODELL, G. ABRAHAM, H. R. RAUD, R. S. SWERDLOFF, D. A. FISHER: *Influence of Immunization Procedures in the Titer, Affinity and Specificity of Antisera to Glycopolypeptides*, Acta Endocrinol. (Copenhagen), Suppl. **142** (1969) 54-76.
- [401] A. FROESE, A. H. SEHON: *Kinetic and Equilibrium Studies of the Reaction Between Anti-p-nitrophenyl Antibodies and a Homologous Hapten*, Immunochemistry **2** (1965) 135-143.
- [402] A. FROESE, A. H. SEHON: *Determination of the Kinetics of Antibody-hapten Reactions with the Temperature-jump Method*, in: Methods in Immunology and Immunochemistry, C. A. Williams, M. W. Chase (Eds.), Vol. III, pp. 412-427, Academic Press, New York 1971.
- [403] A. FROESE: *Kinetic and Equilibrium Studies on 2,4-Dinitrophenyl Hapten-antibody Systems*, Immunochemistry **5** (1968) 253-264.

- [404] Å. LARSSON, B. AXELSSON: *Calculation of Affinity Constants Directly from Homologous Displacement Curves*, J. Immunol. Meth. **137** (1991) 253-259.
- [405] Zit. in: U. WESTPHAL: *Steroid-protein Interaction: From Past to Present*, J. Steroid Biochem. **19** (1983) 1-15.
- [406] U. PIRAN, W. J. RIORDAN: *Dissociation Rate Constant of the Biotin-streptavidin Complex*, J. Immunol. Meth. **133** (1990) 141-143.
- [407] D. J. PANKA, M. N. MARGOLIES: *Complete Variable Region Sequences of Five Homologous High Affinity Anti-digoxin Antibodies*, J. Immun. **139** (1987) 2385-2391.
- [408] T. W. SMITH, K. M. SKUBITZ: *Kinetics of Interactions Between Antibodies and Haptens*, Biochemistry **14** (1975) 1496-1502.
- [409] D. M. KRANZ, J. N. HERRON, E. W. VOSS, JR.: *Mechanisms of Ligand Binding by Monoclonal Anti-fluorescyl Antibodies*, J. Biol. Chem. **257** (1982) 6987-6995.
- [410] J. N. HERRON, E. W. VOSS, JR.: *Analysis of Heterogeneous Dissociation Kinetics in Polyclonal Populations of Rabbit Anti-fluorescyl-IgG Antibodies*, Mol. Immunol. **20** (1983) 1323-1332.
- [411] P. C. WEBER, D. H. OHLENDORF, J. J. WENDOLOSKI, F. R. SALEMME: *Structural Origins of High-affinity Biotin Binding to Streptavidin*, Science **243** (1989) 85-88.
- [412] L. G. BACHAS, M. E. MEYERHOFF: *Theoretical Models for Predicting the Effect of Bridging Group Recognition and Conjugate Substitution on Hapten Enzyme Immunoassay Dose-response Curves*, Anal. Biochem. **156** (1986) 223-238.
- [413] J. M. COLL: *Heme Increases Peroxidase-antibody Activity in Aged Conjugates*, J. Immunol. Meth. **104** (1987) 259-263.
- [414] E. TRIFILIEFF, M. C. DUBS, M. H. V. VAN REGENMORTEL: *Antigenic Cross-reactivity Potential of Synthetic Peptides Immobilized on Polyethylene Rods*, Mol. Immunol. **28** (1991) 889-896.
- [415] H. M. JOHNSON, J. K. RUSSELL, C. H. PONTZER: *Superantigene als Krankheitsfaktoren*, Spektrum der Wissenschaft Juni 1992, 96-106.
- [416] N. R. ROSE: *Autoimmunkrankheiten*, in: Immunsystem: Abwehr und Selbsterkennung auf molekularem Niveau, 2. Aufl., G. Köhler (Ed.), S. 114-127, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg 1988.
- [417] G. J. KNIGHT, P. WYLIE, M. S. HOLMAN, J. E. HADDOW: *Improved <sup>125</sup>I Radioimmunoassay for Cotinine by Selective Removal of Bridge Antibodies*, Clin. Chem. **31** (1985) 118-121.
- [418] S. R. JONES, S. AMATAYAKUL: *Improved <sup>125</sup>I Radioimmunoassay for Cotinine*, Clin. Chem. **31** (1985) 1076-1077.

- [419] K. LANDSTEINER: *Die Spezifität der Zellantigene, Die Spezifität der serologischen Reaktionen*, S. 36-38, Springer, Berlin 1933.
- [420] S. I. WIE, B. D. HAMMOCK: *Comparison of Coating and Immunizing Antigen Structure on the Sensitivity and Specificity of Immunoassays for Benzoylphenylurea Insecticides*, J. Agric. Food Chem. **32** (1984) 1294-1301.
- [421] P. ULRICH, R. NIESSNER: *Sensitive Fluorescence Immunoassay for Terbutylazine*, Fresenius Environ. Bull. **1** (1992) 22-27.
- [422] H. LABROUSSE, J.-L. GUESDON, J. RAGIMBEAU, S. AVRAMEAS: *Miniaturization of  $\beta$ -Galactosidase Immunoassays Using Chromogenic and Fluorogenic Substrates*, J. Immunol. Meth. **48** (1982) 133-147.
- [423] Z. HUANG, N. A. OLSON, W. YOU, R. P. HAUGLAND: *A Sensitive Competitive ELISA for 2,4-Dinitrophenol Using 3,6-Fluorescein Diphosphate as a Fluorogenic Substrate*, J. Immunol. Meth. **149** (1992) 261-266.
- [424] K. ICHIHARA, T. YAMAMOTO, M. AZUKIZAWA, K. MIYAI: *Kinetic Aspects of the Antigen-antibody Reaction in Various Radioimmunoassays: Effect of Delayed Addition of Labeled or Unlabeled Antigens on Sensitivity of Assay*, Clin. Chim. Acta **98** (1979) 87-101.
- [425] R. F. VINING, P. COMPTON, R. MCGINLEY: *Steroid Radioimmunoassay - Effect of Shortened Incubation Time on Specificity*, Clin. Chem. **27** (1981) 910-913.
- [426] D. RODBARD, H. J. RUDER, J. VAITUKAITIS, H. S. JACOBS: *Mathematical Analysis of Kinetics of Radioligand Assays: Improved Sensitivity Obtained by Delayed Addition of Labeled Ligand*, J. Clin. Endocrin. Metab. **33** (1971) 343-355.
- [427] A. ZETTNER, P. E. DULY: *Principles of Competitive Binding Assays (Saturation Analyses). II. Sequential Saturation*, Clin. Chem. **20** (1974) 5-14.
- [428] J. J. PRATT, M. G. WOLDRING: *Radioimmunoassay Specificity and the "First-come, First-served Effect"*, Clin. Chim. Acta **68** (1976) 87-90.
- [429] ALCHEMY II, *Molecular Modeling Software*, Tripos Associates, Inc., Evans & Sutherland, St. Louis 1988.
- [430] B. NAGY, W. P. JENCKS: *Depolymerization of F-Actin by Concentrated Solutions of Salts and Denaturing Agents*, J. Amer. Chem. Soc. **87** (1965) 2480-2488.
- [431] D. R. ROBINSON, W. P. JENCKS: *The Effect of the Urea-guanidinium Class on the Activity Coefficient of Acetyltetraglycine Ethyl Ester and Related Compounds*, J. Amer. Chem. Soc. **87** (1965) 2462-2479.
- [432] P. H. VON HIPPEL, K.-Y. WONG: *Neutral Salts: The Generality of their Effects on the Stability of Macromolecular Conformations*, Science **145** (1964) 577-580.

- [433] S. A. LEVISON, F. KIERSZENBAUM, W. B. DANDLIKER: *Salt Effects on Antigen-antibody Kinetics*, Biochemistry **9** (1970) 322-331.
- [434] M. GROHL, M. SCHULZE: *Immunoassays für lösliche Antigene: Ein Überblick*, in: Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung, 2. Aufl., J.H. Peters, H. Baumgarten (Eds.), S. 325, Springer, Berlin 1988.
- [435] The Pesticide Manual, 9th Ed., p. 797-800, C. R. Worthing, R. J. Hance (Eds.), British Crop Protection Council, Farnham 1991.
- [436] J. R. DUDLEY: *Cyanuric Chloride Derivatives. IX. Dissociation Constants of Substituted Melamines and Related Triazines*, J. Amer. Chem. Soc. **73** (1951) 3007-3008.
- [437] E. FLUCK, M. BECKE-GOEHRING: Einführung in die Theorie der quantitativen Analyse, 6. Aufl., S. 57, Steinkopff, Darmstadt 1980.
- [438] D. E. WYLIE, L. D. CARLSON, R. CARLSON, F. W. WAGNER, S. M. SCHUSTER: *Detection of Mercuric Ions in Water by ELISA with a Mercury-specific Antibody*, Anal. Biochem. **194** (1991) 381-387.
- [439] J.H. PETERS, H. BAUMGARTEN (Eds.), Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung, 2. Aufl., Springer, Berlin 1988.
- [440] P. TUISSEN: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam 1985.
- [441] T. CHARD: An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, 3rd. Ed., R. H. Burdon, P.H. van Knippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam 1987.
- [442] S. MULLER: *Immunization with Peptides*, in: Synthetic Polypeptides as Antigens, R. H. Burdon, P. H. van Knippenberg (Eds.), pp. 131-144, Elsevier, Amsterdam 1988.
- [443] D. CATTY: Antibodies - A Practical Approach, Vol. II, IRL, Oxford 1989.
- [444] J. H. PETERS, M. SCHULZE, M. GROL: *Wie finde ich den richtigen monoklonalen Antikörper?*, in: Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung, 2. Aufl., J.H. Peters, H. Baumgarten (Eds.), S. 317-321, Springer, Berlin 1988.
- [445] H. NYGREN, C. CZERKINSKY, M. STENBERG: *Dissociation of Antibodies Bound to Surface-immobilized Antigen*, J. Immunol. Meth. **85** (1985) 87-95.
- [446] M. G. WELLER, L. WEIL, R. NIESSNER: *Determination of Triazine Herbicides by ELISA - Optimization of Enzyme Tracer Synthesis*, Fresenius J. Anal. Chem. **343** (1992) 51-52.
- [447] Gel Filtration - Principles and Methods, 5th. ed., Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala 1991.

- 
- [448] H.-D. JAKUBKE, H. JESCHKEIT: Aminosäuren, Peptide, Proteine, S. 130-131, Verlag Chemie, Weinheim 1982.
- [449] K. BARLOS, D. PAPAIOANNOU, D. THEODOROPOULOS: *Efficient "One-pot" Synthesis of N-Trityl Amino Acids*, J. Org. Chem. **47** (1982) 1324-1326.
- [450] L. JULLIEN, J.-M. LEHN: *The "Chundle" Approach to Molecular Channels - Synthesis of a Macrocyclic-based Molecular Bundle*, Tetrahed. Lett. **29** (1988) 3803-3806.
- [451] H. EBATO, J. N. HERRON, W. MÜLLER, Y. OKAHATA, H. RINGSDORF, P. SUCI: *Spezifische Bindung einer funktionellen Proteinschicht an eine trägerfixierte Streptavidinmatrix*, Angew. Chem. **104** (1992) 1064-1066.
- [452] L. GIANFREDA, M. R. SCARFI: *Enzyme Stabilization: State of the Art*, Molec. Cell. Biochem. **100** (1991) 97-128.
- [453] H. BAUMANN: *Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet fettchemischer Tenside*, Henkel-Referate **27** (1991) 5-8.
- [454] J. SZEITLI: *Cyclodextrins in Diagnostics*, Kontakte (Darmstadt) **1** (1988) 31-36.
- [455] R. J. SCHNEIDER: *Persönliche Mitteilung*, Institut für Wasserchemie, Technische Universität München 1991.
- [456] C. WITTMANN: unveröffentlicht.
- [457] T. GIERSCH: unveröffentlicht.
- [458] J. MANGLER: unveröffentlicht.
- [459] R. J. SCHNEIDER: *Persönliche Mitteilung*, Institut für Wasserchemie, Technische Universität München, 1992.
- [460] H. G. SCHLEGEL: *Allgemeine Mikrobiologie*, 3. Aufl., S. 267-277, Thieme, Stuttgart 1974.
- [461] R. J. SCHNEIDER: *Immunologische Bestimmung von Triazinherbiziden in Boden und Wasser: Grundlagen, Verifizierung und Fehlerquellen*, Diplomarbeit, S. 122-127, Fakultät Chemie, Biologie und Geowissenschaften der Technischen Universität München, 1989.
- [462] The Pesticide Manual, 9th Ed., C. R. Worthing, R. J. Hance (Eds.), British Crop Protection Council, Farnham 1991.
- [463] S. MOORE: *Amino Acid Analysis: Aqueous Dimethyl Sulfoxide As Solvent for the Ninhydrin Reaction*, J. Biol. Chem. **243** (1968) 6281-6283.

- 
- [464] S. MOORE, W. H. STEIN: *A Modified Ninhydrin Reagent for the Photometric Determination of Amino Acids and Related Compounds*, J. Biol. Chem. **211** (1954) 907-913.
- [465] R. FIELDS: *The Rapid Determination of Amino Groups with TNBS*, Meth. Enzymol. **25** (1972) 464-468.
- [466] *Polymerträger VA-Epoxy BIOSYNTH - Polymerträger zur kovalenten Immobilisierung von Enzymen*, Informationsblatt, Riedel-de Haën, Seelze 1987.
- [467] K. BAUER, L. GROS, W. SAUER: Dünnschicht-Chromatographie, Hüthig, Heidelberg 1989.