

Immunchemische Methoden in der Umweltanalytik

Habilitationsschrift
zur Erlangung des Grades eines
Dr. rer. nat. habil.
an der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Dr. rer. nat. Michael G. Weller
geboren in Stuttgart

München, Dezember 2000

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Multidimensionale Immunoassays	17
2.1	Grundlagen	17
2.2	Realisierung von multidimensionalen Systemen	20
2.3	Substrate von Biochips	21
2.4	Reinigung der Oberflächen	22
2.5	Aktivierung der Oberflächen	23
2.6	Strukturierung von Biochips	25
2.7	Paralleler Affinitätssensor-Array (PASA)	27
2.7.1	Konzept	27
2.7.2	Chemilumineszenz	29
2.7.3	Detektoren	32
2.7.4	Optik	34
2.7.5	Flüssigkeitssystem (Liquid Handling)	35
2.7.6	Miniaturisierung	38
2.7.7	Biofilme	38
2.7.8	Entgasung	38
2.7.9	Steuerung	39
2.7.10	Kalibrierung	40
2.7.11	Qualitätssicherung	41
2.7.12	Auswertung	41
2.7.13	Regeneration	43
2.7.14	Direkte Assays	44
2.7.15	Indirekte Assays	47
3	Immunologische Teststreifen	49
3.1	Teststreifensysteme	49
3.2	Homogene Immunoassays	50
3.2.1	EMIT	50
3.2.2	SLFIA	50
3.2.3	CEDIA	50
3.2.4	FRET	51
3.2.5	EMMIA	51
3.2.6	CLIA	51
3.2.7	ECIA	52
3.2.8	LIA	52
3.2.9	ARIS	52

3.2.10	AICREIA	53
3.3	Aufbau eines ARIS	54
3.3.1	Apoenzym	54
3.3.2	Antikörper	56
3.3.3	Konjugat aus prosthetischer Gruppe und Hapten	57
3.3.4	Synthese von FAD-TNT-Konjugaten	59
3.3.5	Funktionsprüfung des FAD-TNT-Konjugats	60
3.3.6	Hintergrundfärbung durch Wasserstoffperoxid	61
3.3.7	Optimierung des ARIS	62
3.3.8	Übertragung in ein Teststreifenformat	63
3.3.9	Stabilisierung der Komponenten	63
3.3.10	Präzipitationsmittel	66
3.3.11	Kalibrierung	67
3.3.12	Qualitätskontrolle	68
3.3.13	ARIS-Teststreifen für neue Analyten	68
4	Detektion von gebundenen Rückständen	69
4.1	Definitionen	69
4.2	Konventionelle Methoden	73
4.2.1	¹⁴ C-Markierung	73
4.2.2	¹³ C-Markierung	73
4.2.3	IR-Spektroskopie	74
4.2.4	Massenspektrometrie	74
4.2.5	Überkritische Extraktion ("Dextraktion")	74
4.2.6	Elementaranalyse	75
4.2.7	Chemische Spaltung	75
4.2.8	Thermische Spaltung	76
4.3	Immunologische Methoden	77
4.3.1	Einführung	77
4.3.2	Standardmaterialien	77
4.3.3	Kreuzreaktionen	79
4.3.4	Unspezifische Bindung (NSB)	82
4.3.5	Verfügbarkeit von Antikörpern	84
4.3.6	Solubilisierung von kovalent gebundenen Rückständen	85
4.3.7	Kompetitive Immunoassays	86
4.3.8	Nicht-kompetitive Immunoassays	86
4.3.9	Direkte Detektion von Haptenen	88
4.3.10	Huminsäureantikörper	89
4.3.11	Primärantikörper	90
4.3.12	Sekundärantikörper	91
4.3.13	Quantifizierung	92
4.3.14	Verbesserte Quantifizierung durch Inhibitionstests	93
4.3.15	Probleme der Quantifizierung	95
4.3.16	Strukturaufklärung	95
4.3.17	Applikationen	96
5	Zusammenfassung	97
6	Ausblick	99

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	5
7 Abkürzungen/Glossar	115
8 Danksagungen	117
9 Publikationsverzeichnis	119
10 Anhang	123

Kapitel 1

Einleitung

Immunoassays gehören zu den ältesten analytischen Verfahren überhaupt. Obwohl schon Ende des 19. Jahrhunderts immunologische Arbeiten veröffentlicht wurden, kann SVANTE ARRHENIUS' Werk "Immunochemie" aus dem Jahr 1907 als der Beginn der quantitativen Immunologie angesehen werden [1]. ARRHENIUS beschreibt in diesem Buch die "Anwendungen der physikalischen Chemie auf die Lehre von den physiologischen Antikörpern" und zog so den Zorn der medizinischen Fachkollegen auf sich, die es als unmöglich ansahen, daß immunologische Systeme mit einfachen Naturgesetzen erklärbar sein sollten. Wie allgemein bekannt ist, hat sich ARRHENIUS später nie wieder mit der Immunologie beschäftigt. Auch ein anderer Name ist entscheidend mit der Entwicklung der Immunoassays in chemischem Umfeld verknüpft. Es handelt sich hier um KARL LANDSTEINER, der als Entdecker der Blutgruppen bekannt wurde. Sein Lebenswerk war aber die systematische Untersuchung der Reaktivität von Antikörpern und deren Herstellung. So hat LANDSTEINER erstmals Hapten-Konjugate synthetisiert und damit die chemisch-strukturellen Zusammenhänge zwischen Antigen und Antikörper untersucht [2]. So gehen viele immunologische Grundregeln auf LANDSTEINER zurück, z.B. daß Haptene auf der entgegengesetzten Seite eines wichtigen molekularen Strukturelements gekoppelt werden sollen. Auch die Erkenntnis, daß Antikörper Stereoisomere und sogar Enantiomere unterscheiden können, wurde von ihm erstmals veröffentlicht. Das hohe Alter dieser Publikationen führt gelegentlich dazu, daß diese Erkenntnisse in Vergessenheit geraten und heute wiederentdeckt werden [3, 4]. LANDSTEINER muß genaugenommen auch als Erfinder des kompetitiven Immunoassays gelten, den er in einem Präzipitationsformat durchgeführt hat. Dieses Format ist zwar unempfindlicher als die heute gebräuchlichen Tests, es handelt sich aber eindeutig um das Prinzip eines kompetitiven Assays, da die Inhibition der Präzipitation bestimmt wurde. Darüberhinaus wurden von LANDSTEINER Kreuzreaktionstabellen publiziert.

Erst in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts begann der Durchbruch der Immunoassays durch die Einführung von radioaktiven Isotopen, die eine extrem sensitive Detektion ermöglichten. EKINS [5], sowie BERSON und YALOW [6], müssen in diesem Zusammenhang genannt werden. Schon in der Mitte der 70er-Jahre sind die Arbeiten auf immunologischem Gebiet so zahlreich und vielfältig, daß an dieser Stelle keine sinnvolle Würdigung möglich ist. So wurde mit der Einführung der enzymatischen Markierungen [7, 8] die Beschränkung auf Sicherheitslabors aufgehoben.

Die Entwicklung der Hybridomatechnologie zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern (KÖHLER und MILSTEIN [9]) war ein weiterer Meilenstein auf dem Weg der immunologischen Analytik, da erstmals zuverlässig Reagenzien gleichbleibender Qualität hergestellt werden konnten. Heute haben sich Immunoassays auf breiter Front im klinischen und pharmazeutischen Bereich etabliert. Antikörper und Immunoassays sind ein Milliarden-€-Markt geworden, mit stark zunehmender Tendenz. Trotzdem gibt es aufgrund besonderer Anforderungen auch Bereiche, die weitgehend immunoassayfrei geblieben sind. Dazu gehört u.a. die Umweltanalytik. Die Analyse der Schwachstellen von Immunoassays und Versuche, diese zu überwinden, stellen das Leitmotiv der hier vorgestellten Arbeiten dar. Die Weiterentwicklung von immunologischen Verfahren vollzieht sich in verschiedene Richtungen [10]. So wird versucht, Immunoassays so einfach und preisgünstig zu machen, daß breite Anwenderschichten erschlossen werden können. Hier muß z.B. erreicht werden, daß man auf teure und komplizierte Gerätschaften vollständig verzichten kann. Eine Realisierungsmöglichkeit ist der immunologische Teststreifen, der rein visuell abgelesen wird. Eine andere Entwicklungsrichtung ist die Biosensorik. Hier muß nicht unbedingt auf komplexe Ausrüstung verzichtet werden, dafür ist die Automatisierung und Zeitauflösung ein wichtiges Kriterium. Auch kann man hier eher quantitative Werte erwarten, im Gegensatz zu Teststreifen. Eine weitere Möglichkeit ist die Kopplung immunologischer Methoden mit konventionellen Verfahren (z.B. die Kopplung Immunanreicherung und HPLC). Und letztendlich ist noch ein großer Forschungsbedarf bei der Weiterentwicklung der Immunoassays selbst und der entsprechenden Reagenzien zu erkennen.

Bei Immunoassays werden zwei grundlegende Typen unterschieden, die kompetitiven (siehe Abb. 1.1 und Abb. 1.2) und die nichtkompetitiven Assays (siehe Abb. 4.3). Erstere messen eine Competition (Wettbewerb) z.B. eines markierten Analyten mit dem Analyten aus der Probe mit den in begrenzter Anzahl vorhandenen Antikörperbindungsstellen. In gewissem Sinne handelt es sich hier um einen Inhibitionsmechanismus. Aus diesem Grund erhält man auch Kalibrierkurven mit negativer Steigung – hohe Analytkonzentrationen korrelieren mit niedrigen Signalen. Im Gegensatz hierzu ergeben nichtkompetitive Assays Kurven mit positiver Steigung. Es werden hier direkt die besetzten Bindungsstellen gemessen. Es ist einleuchtend, daß diese Assaytypen aufgrund ihrer grundlegend unterschiedlichen Mechanismen auch ein grundlegend unterschiedliches Verhalten z.B. bezüglich Variation und Optimierung von experimentellen Parametern haben. Exemplarisch soll nur die Änderung der Antikörperkonzentration genannt werden. So müssen kompetitive Assays bei möglichst niedriger Antikörperkonzentration durchgeführt werden, um maximale Empfindlichkeit zu gewährleisten, bei nichtkompetitiven Assays hingegen muß versucht werden, eine möglichst hohe Antikörperkonzentration zu verwenden.

Häufig werden Immunoassays auch nach der Art der Markierung eingeteilt. Völlig markierungsfreie Assays – obwohl sehr elegant – lassen oft an Empfindlichkeit und Selektivität zu wünschen übrig. Dies ist auch der wichtigste Grund, warum in der Umweltanalytik markierungsfreie Methoden keine Rolle spielen. Wahrscheinlich die ältesten Label sind radioaktive Isotope, wie ^3H , ^{14}C und ^{125}I . Besonders die ersteren haben den Vorteil, daß die chemische Struktur des Tracers der des Analyten weitgehend gleicht, und somit störende Effekte verschiedener Affinitäten ausgeschlossen werden können. ^{125}I zeigt eine besonders hohe Detektionseffizienz und war daher lange Zeit das empfindlichste Label

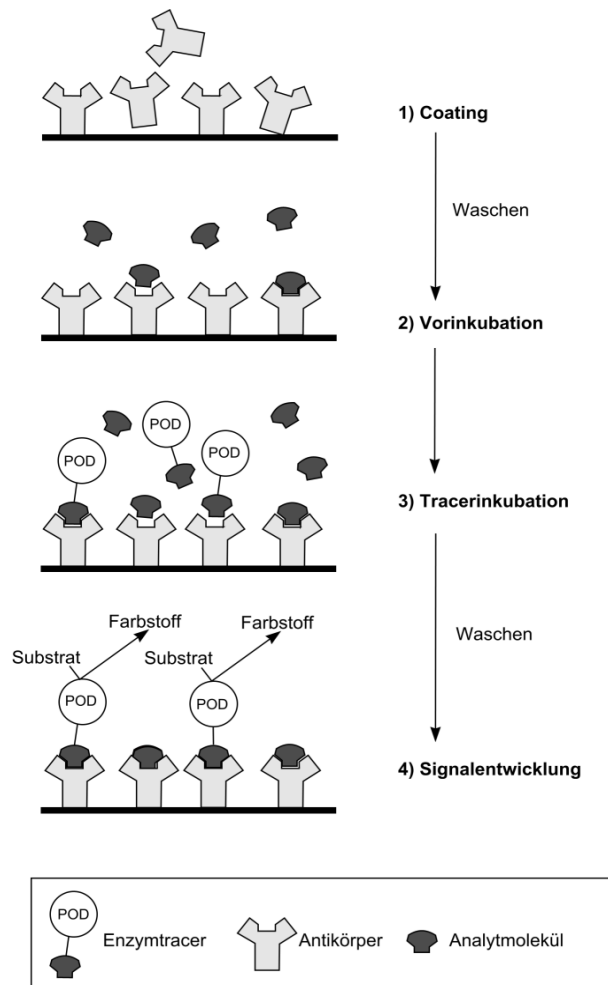


Abbildung 1.1: Schema eines direkten, kompetitiven Immunoassays

überhaupt. Heute überwiegen aber weitgehend enzymatische Label, da sie ohne weitergehende Sicherheitsmaßnahmen benutzt werden können und eine bessere Langzeitstabilität aufweisen. Die wichtigsten Enzyme sind hier Meerrettich-Peroxidase und Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm. Die Detektion der Enzymlabel kann wiederum chromogen, fluorogen oder durch Chemilumineszenz erfolgen. Interessanterweise werden häufig chromogene Substrate bevorzugt, da man den Reaktionsverlauf mit dem Auge verfolgen und trotz photometrischer Detektion extrem niedrige Detektionsgrenzen des Labels¹ erreichen kann.

Ein wichtiger Aspekt bei Immunoassays sind die Kreuzreaktionen. Da die Antikörper-Bindung im weitesten Sinne auf dem Pauling'schen Schlüssel-Schloß-Prinzip beruht, sind Kreuzreaktionen ähnlicher Analyten prinzipiell nicht zu vermeiden. Üblicherweise wird eine Definition von ABRAHAM [11] verwendet, die die Kreuzreaktion als den Quotienten zwischen Testmittelpunkt (Wendepunkt

¹Im Bereich von 10^{-15} mol/L

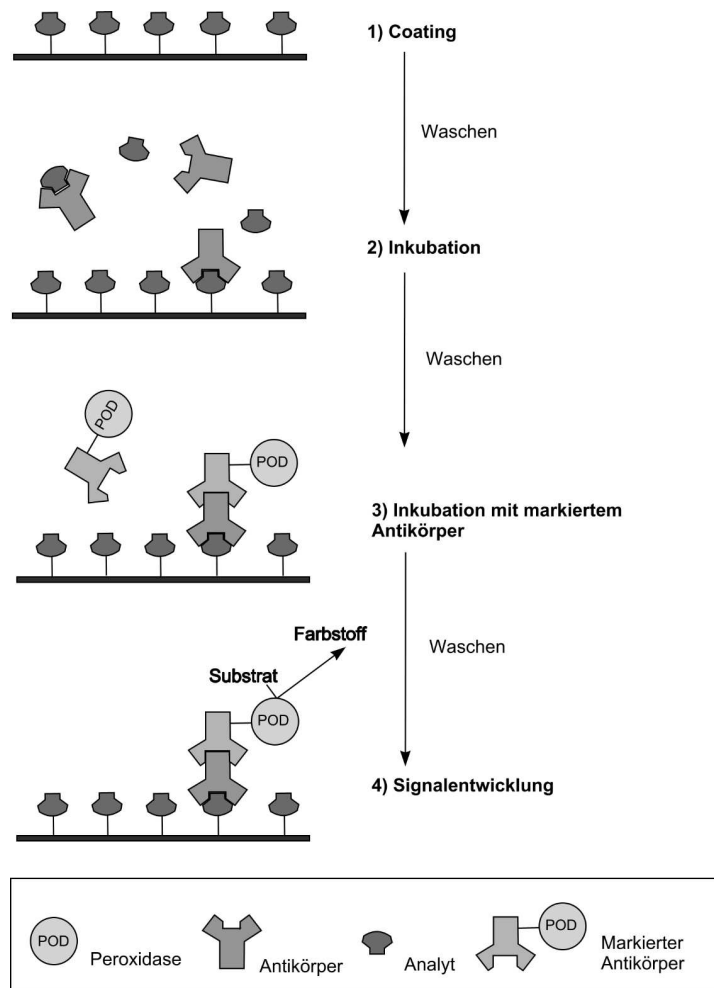


Abbildung 1.2: Schema eines indirekten, kompetitiven Immunoassays

der Kalibrierkurve) der Standardsubstanz und dem Testmittelpunkt der zu untersuchenden Substanz in Prozent angibt. Da die Auswahl der Standardsubstanz einer gewissen Willkür nicht entbehrt, können auch Kreuzreaktionen über 100% auftreten. Dies muß aber keine analytische Bedeutung haben, z.B. wenn eine solche Substanz in Realproben nicht zu erwarten ist. Schwieriger ist die Interpretation der Immunoassay-Meßdaten. So gehen die Meinungen auseinander, inwieweit eine Immunoassay-Messung überhaupt mit konventionellen analytischen Methoden verglichen werden sollten. Genaugenommen können bei einem Immunoassay nur sogenannte "Äquivalent-Konzentrationen" angegeben werden, die auf die Standardsubstanz bezogen sind. Da wie oben angemerkt die Auswahl dieser Substanz relativ willkürlich ist, ist die Aussage, daß ein Immunoassay "überbestimmt" oder "unterbestimmt", eine direkte Funktion dieser Auswahl und daher beliebig beeinflussbar. Nur wenn die chemische Identität des Analyten aufgrund der Randbedingungen der Analyse unzweifelhaft ist, und weitere

kreuzreagierende Komponenten in der Probe ausgeschlossen werden können, ist es statthaft, einen direkten Vergleich einer Immunoassay- und z.B. einer HPLC-Messung durchzuführen [12]². Die Praxis hat gezeigt, daß in diesen Fällen i.d.R. auch keine Diskrepanzen zwischen konventionellen und immunologischen Methoden auftreten. Auch muß man bedenken, daß jeder Antikörper ein individuelles Kreuzreaktionsmuster aufweist und daher "Äquivalent-Konzentrationen" zweier Immunoassays nicht gleichgesetzt werden dürfen. Schwierig wird die Situation bei Substanzmischungen, wie z.B. polycyclischen Aromaten oder PCBs, die in Realproben nie als isolierte Reinsubstanzen vorkommen. Hier hat sich in letzter Zeit eine Methode etabliert, die einen Korrekturfaktor (relative response factor, RRF) verwendet [13, 14]. Der Schlüssel bei diesem Verfahren ist die Annahme einer relativ konstanten Mischung der Analyten. Alles in allem muß aber betont werden, daß entgegen der häufigen Aussage z.B. von Firmenvertretern mit einfachen Immunoassays normalerweise keine Substanzen wirklich identifiziert und quantifiziert werden können. Letzteres ist nur möglich, wenn die Identität des Analyten geklärt ist und die Anwesenheit von kreuzreagierenden Substanzen durch unabhängige Informationen ausgeschlossen werden kann. Ausgehend von dieser Aussage könnte man ins andere Extrem verfallen und sich fragen, ob man überhaupt irgendeine Information mittels einem Immunoassay aus einer unbekanntem Probe ziehen kann. Hier müssen verschiedene Fälle unterschieden werden:

1. In den Proben kann nur eine bestimmte Substanz vorkommen, die von dem betreffenden Antikörper gebunden wird. Diese Situation ist die günstigste und führt zu Werten, die mit anderen analytischen Verfahren im Rahmen der Meßfehler übereinstimmen sollten. Dieser Fall tritt auch ein, wenn andere ähnliche Substanzen eine so geringe Kreuzreaktion aufweisen oder in so niedrigen Konzentrationen vorliegen, daß sie problemlos vernachlässigt werden können.
2. In den Proben kommen mehrere Substanzen vor, die kreuzreagieren. Alle Analyten zeigen aber eine ähnliche Kreuzreaktion. Dies führt gleichfalls zu der unproblematischen Situation, daß ein echter Summenwert erhalten wird. Besonders beim Gruppenscreening wäre eine solche Situation sehr erwünscht. Leider ist es sehr schwierig – bei Haptenen oft nahezu unmöglich – einen solchen Immunoassay zu erzielen. Hier muß angemerkt werden, daß das Mischen von Antikörpern zum Ausgleich von Kreuzreaktionen im kompetitiven Format aus mechanistischen Gründen nicht zum erwünschten Ergebnis führt. Eine chemische Lösung des genannten Problems konnte am Beispiel eines PCB-Immunoassays gezeigt werden [15, 16]. Wird der Analyt im Sinne einer Derivatisierung vor der immunologischen Analyse *in-situ* dechloriert, so gelangt man zu einer einheitlichen Substanz, dem Biphenyl. Dieses Analytderivat kann nun direkt im Immunoassay als molarer Summenwert vermessen werden (siehe Abb. 1.3 und Abb. 1.4).
3. Es können wenige unterschiedliche Substanzen unterschiedlicher Kreuzreaktion anwesend sein. Hier können auch auf Mikrotiterplatten mit meh-

²70% der in dem zitierten Artikel "falsch positiven" Proben konnten auf die Anwesenheit von Prometon oder Desethylatrazin – beides eng verwandte Triazinderivate – zurückgeführt werden. Der restliche Teil der "falsch positiven" Immunoassay-Ergebnisse wurde damit erklärt, daß der Immunoassay eine niedrigere Nachweisgrenze als die Referenzmethode (GC/MS) aufwies.

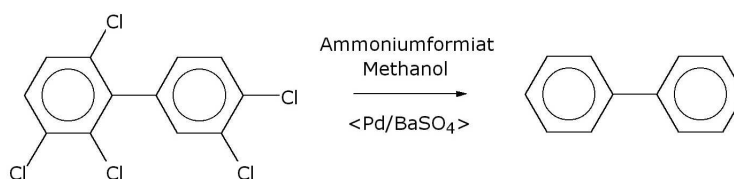


Abbildung 1.3: Schema der katalytischen Dechlorierung von PCBs zur immunologischen Summenbestimmung

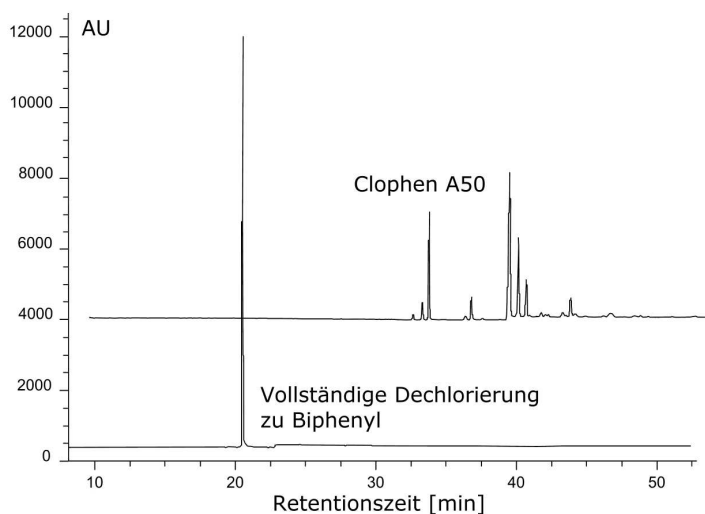


Abbildung 1.4: Gaschromatographische Verifizierung der Dechlorierungseffizienz

renen Antikörpern chemometrische Verfahren angewendet werden, um die Identität und Konzentration des Analyten zu bestimmen. Dies konnte am Beispiel der Triazin-Herbizide Atrazin/Terbutylazin gezeigt werden [17]. Doch nicht nur die Variation von Antikörpern führt zu einer weiteren Dimension, die es ermöglicht, den Analyten zu identifizieren. Auch die Variation des pH-Werts [18], des Tensidgehalts [19] oder Lösungsmittelgehalts [20] in der Probe führt zu zusätzlicher Information.

4. Es können viele unterschiedliche Substanzen unterschiedlicher Kreuzreaktion anwesend sein. Dies ist der allgemeinste und schwierigste Fall, der leider häufig in Realproben anzutreffen ist. Als klassische Beispiele sollen hier PAH-, PCB- oder Nitroaromaten-kontaminierte Proben genannt werden. Es wird oft voreilig behauptet, hier könnte man überhaupt keine Aussage mittels eines Immunoassays machen. Dies ist jedoch nicht der Fall, man kann sogar absolute Grenzwertaussagen erhalten. Besonders wertvoll sind Immunoassays im Fall einer negativen Probe. Da Immunoassays nur in extremen Ausnahmen falsch negative Werte liefern, ermöglicht ein negativer Test eine ganze Anzahl eindeutiger Aussagen. Abgeleitet von den

Kreuzreaktionen bzw. den Einzelnachweisgrenzen kann die *Abwesenheit* aller Substanzen, deren Kreuzreaktion mit diesem Assay getestet wurde, bis zu den individuellen, bekannten Nachweisgrenzen *garantiert* werden. Daher ist die Anwendung von Immunoassays besonders angezeigt, wenn mit wenigen positiven Proben gerechnet wird (Screening). Alle negativ getesteten Proben können sofort aus dem weiteren Procedere genommen werden, was enorme Kosten- und Zeitvorteile bringen kann. Das aktuelle Beispiel der Dioxin/PCB-Kontamination von Geflügel zeigt die Schwäche der konventionellen Analytik. Aus Kostengründen werden nur sehr wenige Stichproben untersucht, so daß es sehr lange dauern kann, bis ein Mißstand entdeckt wird. Mit Immunoassays könnte ein Vielfaches an Proben untersucht werden. Nur im Falle einer positiven Testung wäre eine weitere Untersuchung angezeigt. Man sollte auch die präventive Wirkung von breitem Screening nicht unterschätzen. Schwieriger ist die Anwendung bei Proben, die überwiegend positiv getestet werden. In vielen Fällen ist eine Nachuntersuchung mit einer konventionellen Methode notwendig. Hier kann man auf das Vorscreening oft ohne Nachteil verzichten. Unter bestimmten Randbedingungen ist auch bei einer häufigen Kontamination die Anwendung von Immunoassays sinnvoll. Dies ist dann der Fall, wenn sich das Substanz-Muster in einer Probenserie nur unwesentlich ändert. Dies kann man z.B. bei einer Boden-Altlast häufig voraussetzen.

Eine professionelle Vorgehensweise wäre z.B. die folgende: Man nimmt eine kleinere Anzahl von Bodenproben an unterschiedlichen Stellen der Altlast und untersucht sie sowohl konventionell (z.B. GC oder HPLC) und gleichzeitig mit einem Immunoassay. Zeigen die Proben die geforderte Einheitlichkeit der Zusammensetzung, so kann ein Immunoassay-Screening angewendet werden. Besteht ein gesetzlicher Grenzwert einer Substanz oder Substanzgruppe, so kann ein Korrekturfaktor für den Immunoassay ermittelt werden. Gelingt das nicht, so ist der Immunoassay für diese Applikation ungeeignet. Ein Immunoassay kann auf diese Weise mit Erfolg zum Grenzwertscreening einer großen Anzahl von Proben eingesetzt werden, auch wenn eine Einzelsubstanzanalyse nicht gelingt. Es muß hier betont werden, daß es in erster Näherung gleichgültig ist, welche Kalibriersubstanz für den Immunoassay gewählt wird.

5. Eine allgemeine Lösung des Vielstoff-Problems in der Immunanalytik ist die Anwendung eines ausreichend großen Immunoarrays in Kombination mit chemometrischer Auswertung. Auch wenn die breite Anwendung dieses Konzepts noch aussteht, so konnte doch in mehreren Arbeiten die Machbarkeit eines "Parallelen Affinitätssensor-Arrays", PASA, experimentell gezeigt werden [21, 22, 23, 24, 25]. Bei Affinitätsarrays können i.d.R. alle bisher bekannten heterogenen Immunoassayformate direkt angewendet werden. Beim Übergang in die nächste Dimension sind jedoch zwei grundsätzliche Fälle zu unterscheiden. Der einfachere Fall bezieht sich auf Arrays, bei denen jeder Meßwert zu einer anderen Substanzklasse gehört und überlappende Kreuzreaktionen nicht auftreten. Dieser *unabhängige Array* führt nicht zur Identifizierung von Einzelsubstanzen, sondern zu einem breiten Screening auf viele Substanzklassen. Es ist in diesem Fall keine Chemometrie notwendig, da alle Assays unabhängig ausgewertet werden können. Im zweiten Fall, den *abhängigen Arrays*, existieren überlappen-

de Kreuzreaktionen, die zur Auswertung herangezogen werden (müssen). Hier kann über chemometrische Verfahren eine Aussage über die Anwesenheit und Konzentration von Einzelkomponenten gemacht werden, sofern der Array nicht informationell unterbestimmt ist.

Mit dieser Aufzählung sollte gezeigt werden, daß es bei einer sinnvollen Anwendung von Immunoassays sehr viele Bereiche der Analytik gibt, in denen die Information eines einfachen Immunoassays ausreicht, eine eindeutige Aussage schnell und preisgünstig zu erhalten. Diese Aussage ist jedoch nicht gleichbedeutend mit einer konventionellen Analyse. Um weit verbreitete Mißverständnisse auszuräumen, sei dies an einem praktischen Beispiel erläutert. Nehmen wir an, es sei eine Untersuchung auf Triazinherbizide im Trinkwasser gewünscht.

Die Fragestellung für einen Immunoassay lautet z.B.:

- Sind in dieser Wasserprobe Triazinherbizide oberhalb einer bestimmten Konzentrationsgrenze enthalten?

Ein Immunoassay kann dies im negativen Fall für eine bekannte Liste von Substanzen eindeutig ausschließen. Im positiven Fall (Triazin-Kontamination) kann i.d.R. keine genauere Aussage gemacht werden. Vorteilhaft an diesen Assays ist, daß auch unbekannte, ähnliche Substanzen meistens positive Ergebnisse ergeben. Es ist daher schwierig, Immunoassays "auszutricksen". Ein geeigneter Anwendungsbereich wäre auch die Dopinkontrolle oder die Drogenanalytik.

Die Fragestellung für eine gaschromatographische Analyse wäre z.B.:

- In welcher Konzentration sind Atrazin, Terbutylazin, Simazin und Propazin in dieser Wasserprobe enthalten?

Die Gaschromatographie liefert hier vier quantitative Aussagen. Unbekannte Substanzen werden aber oft nicht gefunden, was sich auch in der Praxis zeigt. Es ist in diesem Fall leicht, die Analytik mit einem exotischen Derivat zu umgehen. Das Analysenergebnis wäre naturwissenschaftlich zwar korrekt, sinngemäß für manche Anwender aber möglicherweise falsch negativ, da andere Triazinherbizide unerkannt in der Wasserprobe enthalten sein können.

Die obige Diskussion zeigt aber auch, daß die Anwendung von Immunoassays häufig die Unterstützung eines immunanalytisch versierten Fachmanns erfordert. Der Laie kann das Potential von Immunoassays heute nur sehr begrenzt ausschöpfen. So ist auffällig, daß eher Analytiker mit wenig Immunoassay-Erfahrung von Problemen berichten, dagegen erfahrenere Fachleute jahrelang Immunoassays mit großem Erfolg in vielen Bereichen einsetzen. Immunoassays werden meist mit Zeit-, Kosten- und Personalargumenten eingeführt. Die Zeit, die ein Immunoassay vom Beginn der Messung bis zum Ergebnis benötigt, liegt oft bei 1-2 Stunden. Auch eine chromatographische Trennung kann in dieser Zeitspanne durchgeführt werden. Man vergißt aber bei dieser Rechnung, daß chromatographische Verfahren – Dünnschicht-Chromatographie sei hier einmal ausgenommen – sequentiell arbeiten. Eine Kalibrierung mit mehreren Punkten ist schlägt damit gleich mit mehreren Stunden zu Buche. Längere Probenserien können sich dann leicht über mehrere Tage hinziehen. Eine Standard-Mikrotiterplatte

(MTP) dagegen bietet 96 Kavitäten, die parallel abgearbeitet werden. Nach Ablauf der Assayzeit von z.B. 2 Stunden sind alle Messungen beendet, inklusive der Kalibrierung. Damit hat ein Immunoassay einen beträchtlichen Zeitvorteil zur Chromatographie, ein Faktor 10 ist sicherlich noch konservativ gerechnet. Immunoassays können zudem auch sehr weitgehend automatisiert werden – es stehen zahlreiche Roboter-Systeme am Markt zur Verfügung. Durch eine intelligente Verschachtelung der Inkubationszeiten der nacheinanderfolgenden MTP kann ein Probendurchsatz von 1000 Proben/Tag leicht erreicht werden. Die Rechnung wird noch günstiger für den Immunoassay, wenn man berücksichtigt, daß eine große Anzahl der Assays ohne oder nur minimaler Probenvorbereitung auskommt. Da die Probenvorbereitung oft einen größeren Aufwand als die Messung an sich erfordert, sinkt der Gesamt-Probendurchsatz im konventionellen Analysenlabor noch weiter ab.

Der Kostenfaktor wird jedoch oft überbewertet. Kommerzielle Immunoassays sind relativ teuer, da in den Kits auch die erheblichen Entwicklungskosten für die Antikörper und andere Reagenzien enthalten sind. So kann eine einzige Immunoassay-Messung bis zu 25 € kosten. Bedenkt man nun, daß Immunoassays nicht multianalytisch sind, so ist der Preis einer chromatographischen Bestimmung pro Analyt oft sogar günstiger. Die Investitionskosten können sich jedoch beträchtlich unterscheiden. Ein halbautomatischer Immunoassay-Meßplatz kostet ca. 10.000-20.000 €. Für ein routinetaugliches Chromatographiesystem muß man schon 50.000-100.000 € veranschlagen, je nach Detektor. Zusammenfassend kann man festhalten, daß das Kostenargument erst dann entscheidend werden könnte, wenn Immunoassays wesentlich billiger werden. Auch das Personal-Argument ist oft irreführend angewendet worden. So ist es keineswegs so, daß für Immunoassays ungelernetes Personal ausreicht, für instrumentelle Analytik dagegen hochqualifiziertes und teures Personal notwendig ist. Die Erfahrung hat gezeigt, daß die entsprechenden Personen ungefähr einen ähnlichen Wissensstand aufweisen müssen. Zwar ist es möglich, einen Immunoassay auch von angelernten Personen durchführen zu lassen, es muß aber auf jeden Fall eine qualifizierte Fachkraft fortlaufend verfügbar sein. Dies ist vergleichbar zu instrumentellen Verfahren. Unterschiede treten eher durch das sehr unterschiedliche Niveau der notwendigen Probenvorbereitung zu Tage. Da große Teile der Probenvorbereitung (auch Clean-up) nicht gut automatisiert werden können, kostet dieser Teil der Analyse viel Arbeitszeit. Eine Methode, die mit einer Minimalprobenvorbereitung auskommt, hat hier einen entscheidenden Vorteil.

Eng mit der Problematik der Kreuzreaktionen verknüpft ist die Frage der Multianalytischkeit von Immunoassays. Generell kann festgestellt werden, daß Immunoassays "konstruktionsbedingt" nicht multianalytisch sind, da jeweils nur ein Meßwert pro Probe gewonnen wird. Berücksichtigt man jedoch das Auftreten von Kreuzreaktionen und einer daraus abgeleiteten "Gruppenselektivität", so kann man durchaus von einer eingeschränkten Multianalytischkeit sprechen, wenn damit die Bestimmung eines Summenwerts strukturell verwandter Verbindungen gemeint sein soll. Die beiden Grenzfälle, die bei Immunoassays auftreten können, "Spezifität" und "Gruppenselektivität" [26] lassen sich leider nur selten verwirklichen. Eine hohe Selektivität zu einer Einzelsubstanz läßt sich gelegentlich durch optimierte Immunisierungen erzielen, wobei "selektiv" auch hier nicht absolut verstanden werden darf. Es gibt immer Substanzen, die kreuzreagieren, es ist nur die Frage, ob diese in der Probe vorkommen können, oder nicht. "Gruppenselektivität" wird sogar noch häufiger gewünscht, um in

Screening-Projekten eine gewisse Breite zu erzielen. Im einfachen Sinn ist eine "Gruppenselektivität" immer vorhanden, die sich aus den gegebenen Kreuzreaktionen herleitet. Leider ist das nicht genau das, was sich die meisten Anwender vorstellen. Ideal wäre ein Summenwert, der die Einzelkomponenten entweder nach Masse oder Anzahl äquivalent gewichtet. Dies ist gerade bei Haptenen (Analyten geringer Molmasse) besonders schwierig und genaugenommen auch nicht erreichbar. Eine Multianalytfähigkeit im engeren Sinne kann nur durch mehrfache Anwendung von Immunoassays erzielt werden. Solche "Immunoarrays" wurden folglich schon vor längerer Zeit vorgeschlagen. Nur die Durchführung war bisher noch nicht wirklich gelungen, da die Multianalytfähigkeit immer mit einer sequentiellen Wiederholung verschiedener Assays verbunden war. Mit der entsprechend häufigen Wiederholung der Immunoassays werden aber alle Zeit- und Kostenargumente *ad absurdum* geführt.

Im Zusammenhang mit der Selektivität bzw. Kreuzreaktivität von immunologischen Verfahren werden auch häufig die Vor- und Nachteile von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern, heute auch zunehmend von rekombinanten Antikörpern diskutiert. Aufgrund eines häufigen Mißverständnisses sei auch hier betont, daß monoklonale Antikörper nicht selektiver sind als polyklonale, auch wenn das der Name zu implizieren scheint. Der "monospezifische"³ Antikörper ist nur eine hypothetische Spezies bzw. ein Grenzfall, der für eine theoretische Behandlung von Immunoassays nützlich sein kann – real existieren kann ein monospezifischer Antikörper aus prinzipiellen Gründen (Schlüssel-Schloß-Prinzip) natürlich nicht. Auch der gruppenspezifische Antikörper, der gleiche Response für eine ganze Gruppe von Analyten aufweist, ist kaum zu realisieren und mehr eine hypothetische Spezies. Beides – der monospezifische als auch der gruppenspezifische Antikörper – wäre in der Immunoassay-Praxis hochwillkommen, da diese Reagenzien die Auswertung erheblich vereinfachen würden. Ein paar Ausnahmen von der Regel, daß gruppenspezifische Antikörper nicht existieren, gibt es trotzdem. Die eine Ausnahme ist die "räumliche Gruppenselektivität". Bei Analyten, die größer sind als die Bindungsstelle des Antikörpers⁴, führen alle Variationen am Analyten, die nicht in der Nähe der Bindungsstelle liegen, zu keiner großen Änderung der Kreuzreaktion. Daher kann in diesem Fall tatsächlich eine größere Gruppe an Analyten identische Kreuzreaktionen aufweisen. Die zweite Ausnahme ist die "Gruppenselektivität durch Derivatisierung". So konnte gezeigt werden [16], daß im Falle der PCBs durch eine Palladium-katalysierte Dechlorierung auch im analytischen Maßstab mit hoher Ausbeute Biphenyl hergestellt werden kann. Nach dieser Derivatisierung können alle PCB-Kongeneren als Biphenyl mit identischer molarer Kreuzreaktion bestimmt werden.

³Angemessener wäre der Begriff *hochselektiv*.

⁴Weitgehend äquivalent mit der Notation "Analyten, die mehrere Epitope besitzen".

Kapitel 2

Multidimensionale Immunoassays

2.1 Grundlagen

Die Entwicklung der Mikroelektronik und der Biosensoren zeigt einige Ähnlichkeiten. So wurde im Bereich der Mikroprozessoren lange Zeit versucht, durch ein verbessertes Design die Leistung zu erhöhen. Auch wenn das bis zum heutigen Tag immer noch in gewissem Maße gelingt, so ist doch eine asymptotische Annäherung an einen Optimalwert zu erkennen, der nicht überschreitbar scheint. Die für den Anwender sichtbare Leistungssteigerung wird heute in viel höherem Maße durch erhöhten Takt und erhöhte Parallelisierung erreicht. Der enorme Preisverfall, der in der Computerbranche stattfindet, hat auch nicht zuletzt mit der Miniaturisierung der Silizium-Bausteine zu tun, da der Preis überproportional mit der notwendigen Fläche auf einem Silizium-Wafer ansteigt. Eine Verkleinerung der Strukturen auf einem Silizium-Chip hat jedoch auch andere positive Auswirkungen, so sinkt die notwendige Spannung, was die Leistungsaufnahme verringert und zudem können durch die verkürzten Leiterbahnen höhere Taktfrequenzen erreicht werden. In Hochleistungscomputern wird zudem Parallelisierung in extremem Maße angewendet (*Massively Parallel Computing*) und hat eine eigene Forschungsrichtung hervorgebracht. Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist, daß auf preisgünstige, kommerzielle Bausteine zurückgegriffen werden kann und auch ein Upscaling bei gesteigertem Leistungsbedarf leicht möglich ist.

Auch in der Analytik sind derartige Tendenzen zu erkennen, das hochaktuelle Gebiet des *High-Throughput-Screenings* (HTS) bringt dies deutlich zum Ausdruck. Auch wenn HTS die Denkweise in der Analytischen Chemie langsam verändert, sind die angewendeten Verfahren doch eher konventionell. Daß man um den Durchsatz zu steigern, statt einem Massenspektrometer zehn einsetzt, beruht zwar auf der Anwendung bewährter Methoden und deren konsequenter Umsetzung. Die hohen Kosten zeigen aber, daß es sich nicht um die eleganteste Methode handelt und das Preis-Informationsverhältnis relativ schlecht ist. Gerade im Bereich des HTS haben jedoch schon früh immunologische und andere biochemische Tests Einzug gehalten, gerade wegen ihrer hervorragenden Parallelisierbarkeit und nicht zuletzt auch, weil man z.B. im pharmazeutischen HTS

in erster Linie an Wirkungen interessiert ist. Auch Robotersysteme haben im HTS Einzug gehalten. Dieser hohe Automatisierungsgrad wird jedoch mit einer geringen Flexibilität erkauft, man screenet in der Regel Tausende Verbindungen immer wieder mit dem gleichen Test. So kann es passieren, daß eine Verbindung, die von einer Firma synthetisiert und in einem Blutdrucksenker-Screening verworfen wurde, Jahre später von einer anderen Firma als Herbizid in großem Stil auf den Markt gebracht wird. Bei multidimensionalen Immunoassays muß man verschiedene Ansätze unterscheiden:

- Sequentielle Assays

Hier wird Multidimensionalität erreicht, in dem Immunoassays mit unterschiedlichen Antikörpern oder Reaktionsbedingungen sequentiell durchgeführt werden. Die Daten werden dann zusammengeführt und ggf. chemometrisch ausgewertet. Aufgrund des proportional ansteigenden Meßaufwands erscheint diese Methodik nur in Ausnahmefällen praktikabel und hat vorwiegend wissenschaftliche Relevanz.

- Pseudo-parallele Assays

Hier werden verschiedene Immunoassays zwar auf einer inhärent parallelen Mikro- oder Nanotiterplatte durchgeführt, da aber die Reagenzien in die einzelnen Kavitäten gefüllt werden müssen, ist ein zeitlicher Versatz der einzelnen Kavitäten normalerweise nicht zu vermeiden. Auch das Auslesen der Kavitäten kann entweder parallel (z.B. CCD) oder sequentiell (z.B. Konfokaler Fluoreszenzscanner) stattfinden.

- Voll-parallele Assays

Um zeitliche Drift-Effekte zu vermeiden, eine optimale Signalintegration zu erreichen und den Assay zeitlich zu beschleunigen, sind voll-parallele Systeme entwickelt worden. Hier wird die komplizierte Herstellung eines Arrays auf die kontrollierten Bedingungen einer kommerziellen Herstellungsumgebung verlagert. Dies bietet verbesserte Möglichkeiten der Qualitätskontrolle und erhebliche Zeitvorteile für den Anwender. Anstatt Mikro- oder Nanotiterplatten werden bei voll-parallelen Assays i.d.R. sog. Biochips verwendet, die ein vorbereitetes Muster an räumlich getrennten Reagenzfeldern aufweisen. Meist wird auf eine Kompartimentierung der Meßkammer verzichtet, was eine erhebliche Vereinfachung des Liquid-Handlings ermöglicht. Zudem kann durch die Verwendung eines CCD-Chips als Detektor eine gleichzeitige Messung aller Reagenzfelder erfolgen. Dies verbessert die Möglichkeiten zur Signalintegration und kann damit die Sensitivität des Systems steigern.

In neueren Publikationen wird auch die Bezeichnung Multiple Analyte Immunoassay (MAIA) bzw. Single Analyte Immunoassay (SAIA) verwendet [27]. Dies erscheint jedoch etwas unglücklich gewählt, da man damit namentlich alle Arten von Multianalyt-Immunoassays in einen Topf wirft. Dagegen wäre ein multidimensionaler Assay, der einen Array zur Identifizierung einer einzelnen Substanz verwendet wird, als SAIA einzustufen. Aus diesen Gründen erscheint die Unterscheidung zwischen *eindimensionalen* ("einfachen") *Immunoassays* und *multidimensionalen* ("komplexen") *Assays* schlüssiger. Bei multidimensionalen Multianalyt-Immunoassays sind noch weitere, weniger bekannte Unterscheidungen zu treffen, die grundsätzliche Bedeutung haben:

- Echte Multianalytfähigkeit mit Substanzidentifizierung

Hier wird ein Affinitätsarray verwendet, der zahlreiche überlappende Kreuzreaktionen aufweist (*Abhängiger Array*). Mit Hilfe chemometrischer Auswertung können Substanzen identifiziert werden (Array darf nicht unterbestimmt sein). Folglich ist auch eine konventionelle Quantifizierung möglich, die nicht auf Konzentrationsäquivalente zurückgreifen muß. Es können jedoch nur bekannte (kalibrierte) Derivate quantifiziert werden. Trotzdem werden unbekannte, strukturell verwandte Substanzen erkannt und können wertvolle Hinweise auf neue Substanzen/Metaboliten etc. geben.

- Pseudo-Multianalytfähigkeit ohne Substanzidentifizierung

Hier wird ein Affinitätsarray verwendet, der nur wenige oder keine überlappenden Kreuzreaktionen aufweist (*Unabhängiger Array*). Somit ist die mögliche Aussage auf Konzentrationsäquivalente beschränkt. Vorteilhaft ist jedoch die enorme Breite des Screenings, das in einer einzigen Messung unzählige Substanzgruppen abdecken kann. Besonders für Kontrollen ohne spezifische Verdachtsmomente sind solche Systeme wertvoll.

Mechanistisch muß man noch zwei weitere Typen unterscheiden:

- Markierungsfreie Systeme

Die direkte Detektion ohne Markierung (Label) ist allgemein sehr wünschenswert, da auf kompetitive Elemente verzichtet werden kann. Letztere führen zu negativen Steigungen der Kalibrierfunktion und begrenztem dynamischen Bereich. Auch sind kompetitive Assays meist streng affinitätslimitiert, was die Verwendung von höchstaffinen Antikörpern erzwingt. Obwohl nichtkompetitive Assays aus mechanistischen Gründen Empfindlichkeitsvorteile aufweisen, läßt sich dies bei markierungsfreien Systemen meist nicht nutzen, da diese häufig detektionslimitiert sind. Doch nicht nur mangelnde Empfindlichkeit, sondern auch Probleme mit der Selektivität treten bei markierungsfreien Verfahren auf.

- Systeme mit markierten Reagenzien

Obwohl man mit der Einführung von Markierungen die o.g. Nachteile in Kauf nehmen muß, basiert die überwiegende Anzahl der manuellen und automatisierten Systeme auf der Detektion von Labeln. Radioaktive Marker werden zunehmend von enzymatischen Markern ersetzt. Letztere haben den Vorteil von hohen Verstärkungsfaktoren, so daß extrem hohe Empfindlichkeiten sogar durch direkte visuelle Auswertung erreicht werden können. Eine weitere Verbesserung der Label-Nachweisgrenzen kann manchmal durch die Verwendung von Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzsubstraten erreicht werden, auch die Anwendung von Enzymkaskaden wurde mehrfach beschrieben. Es muß aber betont werden, daß bei kompetitiven Assays die Nachweisgrenze durch die Affinität des Antikörpers zum Analyten und durch die Reproduzierbarkeit der Messung bestimmt

wird. Die Empfindlichkeit des Labels spielt nur in ungünstigen Fällen eine Rolle. Dies bedeutet umgekehrt, daß die zahlreichen – auch publizierten – Bemühungen, mittels der Anwendung von empfindlicheren Markierungen einen kompetitiven Assay zu verbessern, in fast allen Fällen aus thermodynamischen Gründen zu Scheitern verurteilt sind. Autoren, die gewisse Verbesserungen gefunden zu haben glaubten, konnten keine statistisch abgesicherten Daten zeigen oder veränderten in ihren Experimenten mehrere Parameter gleichzeitig. Nichtkompetitive Assays, die von verbesserten Markern profitieren können, sind jedoch in der Praxis meist blanklimitiert, mit der Folge, daß auch hier neue Marker oft kaum Verbesserungen bringen.

2.2 Realisierung von multidimensionalen Systemen

Multianalyt-Immunoassays wurden schon Mitte der 80er-Jahre von EKINS vorgeschlagen. Von ihm wurde der Ausdruck Immuno-CD geprägt, da er sich den Multianalyt-Immunoassay wie eine Audio-CompactDisk vorstellte, die sequentiell von einem konfokalen Mikroskop ausgelesen würde. Das Problem der Referenzmessungen bei kompetitiven Assays wollte EKINS mit der Verwendung von zwei Labeln lösen, eines für den Tracer und das zweite für den immobilisierten Antikörper. Trotz einzelner Publikationen zum Thema wurde eine konkrete Umsetzung des Systems nicht realisiert. Auch zum jetzigen Zeitpunkt ist die Forschungsaktivität auf dem Gebiet der Multianalyt-Immunoassays noch relativ verhalten – ganz im Gegensatz zu Arbeiten auf dem Gebiet der DNA-Chips.

Die Nomenklatur von Biochips ist etwas unklar und noch nicht konsolidiert. Man kann zum jetzigen Zeitpunkt u.a. folgende Typen unterscheiden:

- *Biochip*: Oberbegriff von analytisch genutzten, planaren, mikrostrukturierten Objekten (Chips), die biochemische Reagenzien nutzen
- *DNA-Chip*: Biochip mit immobilisierten Oligonucleotiden, DNA, PNA o.ä. (auch: Gen-Chip)
- *Protein-Chip*: Biochip mit immobilisierten Proteinen (ggf. auch protein-komplementären Strukturen)
- *Immuno-chips*: Biochips, die Immunoassays als analytisches Prinzip nutzen (auch: Hapten-Chips, Protein-Chips)
- *Hapten-Chip*: Biochip mit immobilisierten Haptenen
- *MIP-Chip*: Chip mit molekular geprägten Polymeroberflächen
- *Zell-Chip*: Chip in Kombination mit lebenden Zellen (auch: "Biochip")
- *Fluidik-Chip*: Chip zur miniaturisierten Durchführung von Flüssigkeitschromatographie, Kapillarelektrophorese [28], Elektrochromatographie u.ä.

- *Elektroden-Chip*: Chip mit integrierten Elektroden für Untersuchungen an Zellen oder für elektrochemische Detektion
- *MS-Chip*: Biochip, dessen Oberfläche massenspektrometrisch analysiert wird (meist: MALDI-TOF).
- *Lab-on-a-Chip*: Meist im Sinne eines Fluidik-Chips gebraucht, Spezialform eines sog. μ -TAS (Miniaturisiertes Totalanalysensystem).

Basierend auf Publikationen zu Einzelanalyt-Sensoren mit Oligonucleotiden, die aus diversen Gründen einfacher zu realisieren sind als deren immunologischen Pendanten, wurden kommerzielle Aktivitäten gestartet, die zu hochparallelen Gen-Chips führten. Am bekanntesten sind die Systeme der Firma Affymetrix, die eine patentierte Methode zur photolithographischen Herstellung von Festphasen-immobilisierten Oligonucleotiden anwendet (*On-Chip*-Synthese). Da nur 4 unterschiedliche Basen zur Herstellung beliebiger Oligonucleotide benötigt werden, ist diese Art der Herstellung begünstigt. Schon die *On-Chip*-Synthese von Peptiden (mind. 20 Aminosäuren) ist wesentlich schwieriger. Doch auch die Herstellung der DNA-Chips scheint von relativ großen Produktionsproblemen begleitet zu sein. Besonders die reproduzierbare Herstellung der Chips und deren Qualitätskontrolle scheinen Probleme zu machen. Da die Regeneration laut Firmenangaben nicht befriedigend gelingt, sind Referenzmessungen mit den Chips nicht möglich. Man muß also blind auf die Qualität der Chips vertrauen. Trotz der Kinderkrankheiten der Affymetrix-Chips haben diese Aktivitäten einen Gen-Chip-Boom ausgelöst. Heute sind eine größere Anzahl an Firmen auf diesem Gebiet aktiv, eine genaue Zahl (> 50) kann nicht mehr angegeben werden.

Das hier ausführlich beschriebene PASA-System (siehe Seite 27) war eines der ersten Realisierungen eines multidimensionalen, parallelen Immunsensors [23, 29]. Auch andere Gruppen (z.B. BRECHT et al.) stellten Multi-Analysensysteme vor, die allerdings meist auf wenige Analyten beschränkt sind. Das sogenannte River-Analyzer-System (RIANA) [30, 31] basiert auf einem TIRF-Sensor (total internal reflection fluorescence) und benutzt einen Laser zur Anregung und mehrere faseroptische Kanäle an einem planaren Wellenleiter zur Detektion. Eine weitere Gruppe (JOOS et al.) hat einen nichtautomatischen Microarray konstruiert, der für die Autoimmundiagnostik eingesetzt werden soll [32]. Von KOCH et al. [33] wurde ein auf antikörperbeschichteten Kapillaren basierendes System publiziert, das die Messung von drei Komponenten erlaubt. Ein sog. Bead Array Counter (EDELSTEIN et al.) nutzt magnetische Mikrokügelchen und magnetoresistive Sensoren für eine Multianalytdetektion [34], hingegen beruht das Multianalysensystem von ROWE-TAITT et al. auf fluoreszenzmarkierten Reagenzien und einer Anregung mit einem Dioden-Laser [35].

2.3 Substrate von Biochips

Das Basismaterial von Biochips sind häufig Glasplättchen, meist in der Form von handelsüblichen Objektträgern, die sowohl sehr kostengünstig sind, in einem nützlichen Format vorliegen und brauchbare optische Eigenschaften aufweisen.

Es können aber auch z.B. Kunststoffplättchen oder Metalloberflächen verwendet werden. Das Objektträgerformat hat sich inzwischen zu einem Quasi-Standard entwickelt, obwohl die verfügbare Fläche für viele Anwendungen unnötig groß erscheint. Vorteilhaft ist aber die Größe insofern, da sie noch ein bequemes manuelles Handling erlaubt, besonders wenn noch ein spezielles mattiertes Ende des Objektträgers vorhanden ist, das zusätzlich die Orientierung des Chips erleichtert. In einigen Fällen stört die Untergrundfluoreszenz des Standardglases, daher werden schon spezielle fluoreszenzarme Objektträger angeboten. Auch chemisch aktivierte oder anders vorbehandelte Chips sind kommerziell erhältlich. Da viele Chips als Wegwerfartikel konzipiert sind, ist die Verwendung von allzu aufwendigen Substraten nicht wirtschaftlich. So werden z.B. Quarz oder Saphir trotz ihrer hervorragenden optischen und mechanischen Eigenschaften nur selten verwendet.

2.4 Reinigung der Oberflächen

Kritisch ist die Reinigung derartiger Substrate, da schon molekulare Mengen von Verunreinigungen aller Art zu Unregelmäßigkeiten der Beschichtung und daher zur Unbrauchbarkeit der Chips führen. Letztendlich sind wohl ähnliche Anforderungen zu stellen, wie sie z.B. in der Herstellung und Verarbeitung von Silizium-Chips gestellt werden. Ein weit verbreitetes Reinigungsmittel ist die sog. *Piranha*-Lösung, die aus 2 Teilen konzentrierter Schwefelsäure (98%) und 1 Teil konzentriertem Wasserstoffperoxid (30%) besteht. Dieses Reinigungsmittel muß mit äußerster Vorsicht gehandhabt werden, da es extrem aggressiv ist und zur spontanen Entzündung von in Kontakt gebrachtem organischem Material führen kann. Die Reinigung mit *Piranha*-Lösung führt zur effektiven Entfernung der meisten organischen und anorganischen Verunreinigungen. Kürzlich wurde jedoch auch die Verwendung von einer Mischung von konzentrierter Salzsäure mit Methanol vorgeschlagen [36], was in unserem Labor mit Erfolg reproduziert werden konnte und sogar *Piranha*-Lösung überlegen zu sein scheint. Eine elegante Methode, die jedoch aufwendiges Gerät erfordert, ist die Plasma-Reinigung, z.B. mit "kaltem" Sauerstoff-Niederdruckplasma. Nicht nur die Effizienz der Plasma-Reinigung ist sehr hoch, auch die Handhabung in einem geschlossenen Behälter verzögert die Rekontamination. Zudem bietet sich die sofort anschließende Plasmapolymerisation zur Oberflächenmodifikation bzw. -vorbereitung an, die nicht nur mit bekannten Monomeren, wie Olefinen oder Ethylenoxid, durchgeführt wird. Auch "nichtaktivierte" Stoffe, wie Methan, können hier eingesetzt werden und bilden polymere Schichten mit sehr interessanten Eigenschaften. Besonders saubere Oberflächen werden auch durch Spaltung von Glimmer-Kristallen gewonnen, die Flächen ergeben, die wirklich molekular eben sind. Dies ist besonders bei der Rasterkraftmikroskopie (AFM, atomic force microscopy) hilfreich. Für die Praxis der Biochip-Herstellung erscheint das Verfahren aber zu aufwendig und teuer. Sehr homogene Oberflächen werden durch Bedampfung mit Metallen, vorwiegend Gold, erhalten.

2.5 Aktivierung der Oberflächen

Als Aktivierung kann man schon die o.g. Metallbeschichtung von entsprechenden Substraten mit Gold oder anderen Edelmetallen ansehen. Häufig werden noch Zwischenschichten (Nickel, Titan, Chrom u.a.) benötigt, z.B. um die Haftung auf Glas zu vermitteln. Die Metalle werden meist durch Aufdampfen im Vakuum aufgebracht, auch wenn prinzipiell Methoden wie CVD (chemical vapor deposition) gleichfalls geeignet wären. Wie im nächsten Abschnitt genauer erläutert wird, dienen Metallschichten meist als Grundlage für sog. Selbstorganisierende Monoschichten (SAMs, self-assembled monolayers), die für geeignete Oberflächeneigenschaften sorgen. SAMs sind auch auf anderer chemischer Grundlage (z.B. Alkoxysilane auf Quarz, Phosphonsäuren auf Titandioxid) möglich und werden auch gelegentlich im Bereich der Biochips/Biosensoren angewendet. Glassubstrate werden sehr häufig mit funktionalisierten Silanen derivatisiert. Im einfachsten Fall sind dies Alkylsilane (z.B. Trimethylchlorsilan), die zu einer Hydrophobierung der Oberfläche führen. Diese hydrophoben Oberflächen können dann wie übliche Mikrotiterplatten (MTP) aus Polystyrol mit Proteinen beschichtet werden, die adsorptiv haften. Da dieses Verfahren sehr effektiv und einfach ist, wird es fast immer bevorzugt, wenn es durchführbar ist. Die häufige Befürchtung, die Biomoleküle würden sich wieder von der Oberfläche lösen, ist weitgehend unbegründet. Problematisch ist oft eher das Gegenteil – die irreversible Adsorption unerwünschter (z.B. Proben-)Komponenten, die sich ohne Zerstörung des Biochips nicht entfernen lassen. Dies unterbindet häufig die Regeneration derartiger Oberflächen.

Gleichfalls oft angewendet werden aminosilanisierte Chips (z.B. mit Aminopropyl-trimethoxysilan, APTS). Für eine technische Anwendung dieser Silane spricht deren Wasserlöslichkeit. Silane werden im Bereich der Oberflächenbehandlung in drei Klassen eingeteilt: Tri-, di-, und monofunktionelle Silane, wobei mit Funktion hier die Anzahl der Abgangsgruppen am Silizium gemeint ist. So gehört APTS zu den trifunktionellen Silanen, die wenn sie mit Wasser (auch Spuren) in Kontakt kommen, langsam zu den entsprechenden Silanolen hydrolysieren. Diese kondensieren dann zu Ketten oder 3-dimensionalen Netzwerken oder verbinden sich mit den Silanolen an der Glasoberfläche. Daraus ergibt sich schon ein entscheidender Nachteil der trifunktionellen Derivate: Sie neigen sehr leicht zur Polymerisation (“Verharzung“) und können daher eine Oberfläche mit unregelmäßigen Polymeraggregaten oder -schichten überziehen. Vorteilhaft ist jedoch die Tatsache, daß trifunktionelle Silane kleine Unregelmäßigkeiten oder Unsauberkeiten des Substrats überdecken bzw. überbrücken können und daher leichter lückenlose, wenn auch dicke Schichten ergeben. Nur lineare Polymere können folglich difunktionelle Silane bilden, die eine gewisse Mittelstellung einnehmen. Die monofunktionellen Silane (z.B. Aminopropyl-dimethyl-methoxysilan) können nur eine Siloxan-Bindung ausbilden und bilden daher außer Dimeren keine Aggregate. Sie sind auf eine lückenlose Schicht an Silanolgruppen an der Oberfläche angewiesen, da ansonsten unweigerlich Lücken auftreten. Der besondere Vorteil der monofunktionellen Silane ist deren Eignung zur Herstellung von “Monoschichten“.

Trotz deren häufigen Verwendung haben die genannten Aminosilane auch erhebliche Nachteile. So ist die primäre Aminofunktion aufgrund ihrer erheblichen Basizität bei neutralem pH-Wert protoniert und damit positiv geladen. Da viele Proteine eher einen neutralen bzw. sauren isoelektrischen Punkt aufwei-

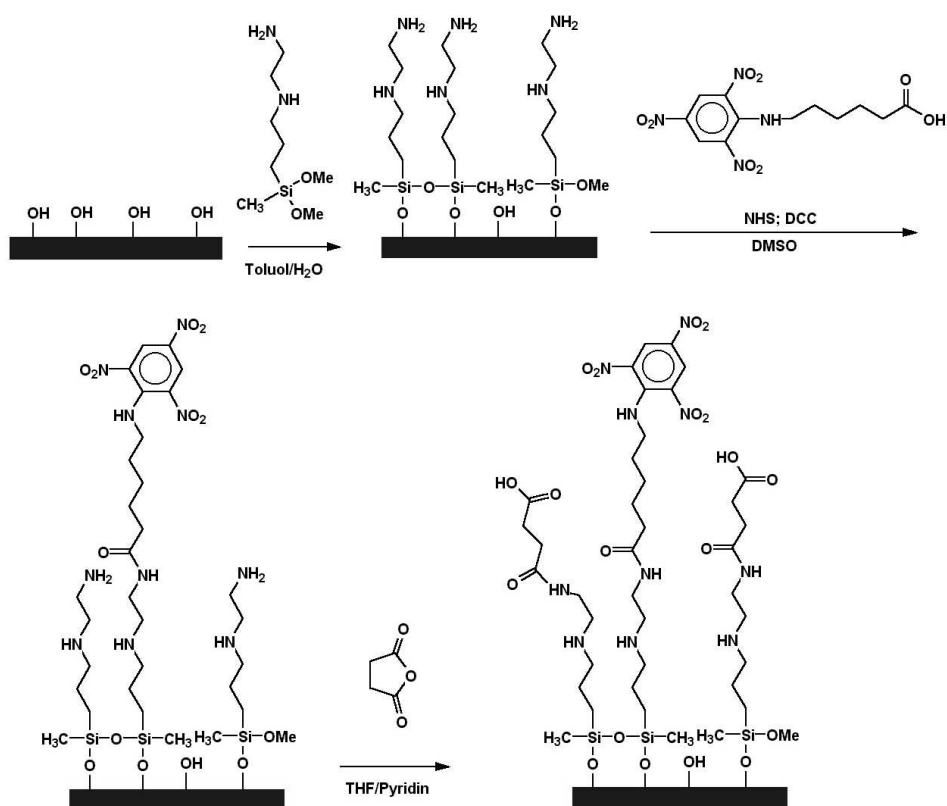


Abbildung 2.1: Aminosilanisierung einer Glasoberfläche und Haptenkopplung (Trinitrophenylderivat) für einen indirekten, kompetitiven Immunoassay

sen, führt dies zu starken ionischen Wechselwirkungen. Auf diesen Effekt wird im Kapitel über gebundene Rückstände noch detaillierter eingegangen. In der Praxis wird dies als "Unspezifische Bindung" (NSB) bezeichnet und ist in hohem Maße unerwünscht. Auch mit aufwendigen Blockierungsmaßnahmen lassen sich diese Effekte nur partiell unterdrücken. Am erfolgreichsten erwies sich das sog. chemische Blocking, bei dem die basischen Aminofunktionen z.B. in neutrale Amide umgewandelt werden (siehe Abb. 2.1). Die Aminofunktionen selbst werden üblicherweise für kovalente Kopplungen der Biomoleküle verwendet, die u.a. über bisfunktionelle Spacermoleküle oder wasserlösliche Carbodiimide erreicht werden können.

Unnötig sind derartige Maßnahmen bei nichtionischen Silanderivaten, von denen insbesondere Epoxysilane Einsatz finden. Überschüssige Epoxidgruppen werden entweder durch eine Inkubation mit Aminosäuren zerstört oder einfach der Hydrolyse überlassen. Besonders letzteres führt zu einer sehr hydrophilen Oberfläche mit zahlreichen Hydroxylgruppen. Da Epoxide elektrophile Derivate darstellen, ist eine Kopplung von Proteinen über nucleophile Gruppen, wie Aminofunktionen oder Thiole, sehr leicht möglich. Weitere Reagenzien (außer einem meist basischen, nichtnucleophilen Puffer) sind nicht erforderlich. Auch die hydrophile Oberfläche entsteht spontan durch Hydrolyse der restlichen Epoxi-

de und führt zu sehr niedriger NSB. Auch andere Oberflächen, wie Chitosan-, Dextran-, Polyethylenglycol-, Cellulose-, Nitrocellulose etc. werden verwendet. Ihre spezifischen Vor- und Nachteile können hier nicht im Detail diskutiert werden. Genannt werden sollen jedoch noch verschiedene Aktivierungsreagenzien, wie Bromcyan (für Cellulose), NHS-Ester (aktivierte Ester für die Kopplung mit Aminogruppen), gemischte Anhydride (für die Kopplung mit Aminogruppen), Maleimid-Gruppen (Thiol-Addition), und photochemische Reagenzien, wie aromatische Azide und Trifluormethylaryldiaziridinen [37]. Viele führen jedoch zu einer eher unerwünschten Hydrophobierung der Oberfläche und müssen daher mit Vorsicht eingesetzt werden. Auch muß betont werden, daß jede Derivatisierung oder Immobilisierung zu einer Denaturierung und damit zum Verlust der biologischen bzw. biochemischen Aktivität führen kann. Die Auswahl der Reagenzien und deren Anwendung ist auch heute noch häufig zu einem erheblichen Teil der Empirie unterworfen.

2.6 Strukturierung von Biochips

Es werden unterschiedlichste Technologien zur Strukturierung von Biochips verwendet. Wahrscheinlich am häufigsten ist die *Ink-Jet*-Technologie anzutreffen, die ursprünglich für die in großen Stückzahlen verkauften Tintenstrahldrucker entwickelt wurde. Es wird meist die Piezo-Technologie bevorzugt (kommerziell von der japanischen Firma Epson bei Tintenstrahldruckern eingesetzt), weniger geeignet ist hier die sog. *Bubble-Jet*-Technologie, die durch die lokale Erhitzung der Tinte eine kleine Dampfblase erzeugt, und damit einen kleinen Tropfen ausstößt. Problematisch erweist sich aber oft der Wechsel der Flüssigkeit in der Piezopumpe. Idealerweise brauchte man für jede Flüssigkeit eine eigene Pumpe. Auch sind Piezopumpen sehr viskositätsabhängig und anfällig gegen Störungen durch Partikel. Piezopumpen (siehe Abb. 2.2 und 2.3) sind nicht selbstansaugend und benötigen daher eine Hilfspumpe zum Füllen (und Waschen). Die Piezo-Technologie ist schon sehr gut entwickelt und hat schon eine gewisse Reife erlangt. Trotzdem wird intensiv an anderen Chip-Herstellungsverfahren gearbeitet.

Erst seit kürzerer Zeit werden Mikropipettierer auf der Basis der *Ring-and-Pin*-Technologie angeboten. Diese "Pipetten" können sehr effektiv gewaschen werden, sind wenig partikelanfällig und auch kaum von der Viskosität abhängig. Problematisch ist z.B. die Neigung zu mondformigen Spots und der Tatsache, daß eine berührungsfreie Beschichtung schwer erreicht werden kann. Eine parallelisierte Variante der Mikropumpen wurde von Imtek bzw. IMIT als TopSpot-Technologie vorgestellt. Hier führt Druckluft zum Ausstoß eines Tropfen-Arrays aus entsprechend vielen Pumpen-Kanälen. Dies vermeidet das aufwendige Zwischenwaschen der Pumpen. An der Stanford-University¹ wurde ein System entwickelt, das auf der Basis von Metall-Stiften mit Kapillarspalten arbeitet, etwa vergleichbar mit einer Metallfeder eines Füllfederhalters.

Völlig anders als die bisher beschriebenen Varianten arbeitet die Fa. Affymetrix, die ihre Oligonucleotid-Chips mit einem photolithographischen Verfahren herstellt. Basis dieser Technologie ist eine photolabile Schutzgruppe, die gezielt mit der Belichtung von Masken abgespalten werden kann. Diese *On-Chip*-Synthese ermöglicht die parallele Synthese von Zigtausenden Oligonucleotiden

¹Informationen unter <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/>

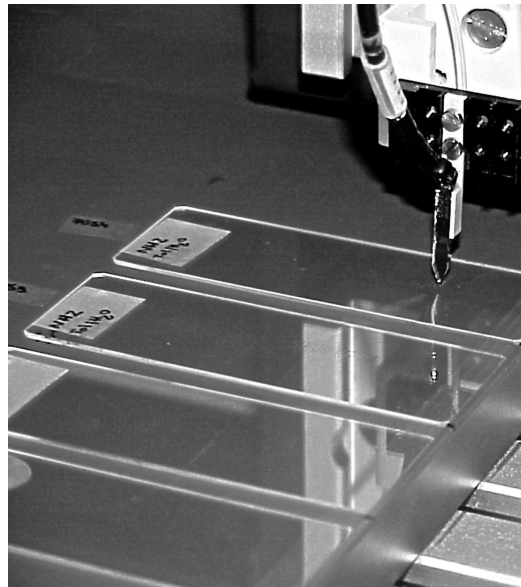


Abbildung 2.2: Herstellung von "Biochips" auf der Basis von Glas-Objektträgern mit einer Piezo-Pipettieranlage der Fa. GeSiM. Oberhalb der Mikropumpe erkennt man die Spannungsversorgung (schwarz) und den Anschluß für die Spülflüssigkeit (transparenter Schlauch)

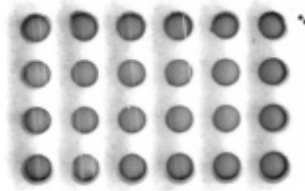


Abbildung 2.3: Mittels Piezopumpen-Technologie (GeSiM-System) strukturierter Glaschip. Spot-zu-Spot-Abstand 1 mm. Detektion: Optischer Scanner, Anfärbung mit Peroxidase/Tetramethylbenzidin/Dextransulfat

in wenigen Schritten. Problematisch soll die Qualitätskontrolle dieser Chips sein, da es kaum möglich ist, festzustellen, ob und in welchem Umfang Synthesefehler aufgetreten sind. Die Gruppe von WHITESIDES hat noch eine andere Variante perfektioniert, das Stempeln von Biochips. Von harten Vorlagen werden Silikon-Stempel mit Mikrometer-Strukturen abgeformt, die nach Eintauchen in die Beschichtungslösung eine strukturierte Biochip-Oberfläche ergeben. Leider ist auch hier die Herstellung von Chips mit sehr vielen unterschiedlichen Komponenten schwierig. WHITESIDES et al. gehen meist von einem Self-Assembly-Ansatz auf Gold/Thiol-Basis aus. Verwendet man langkettige Alkylthiole ($n > 10$), so bilden sich "2-dimensionale" quasi-kristalline Bereiche aus, die sehr stabil sind.

Mittels unterschiedlicher Endgruppen kann nun eine nanostrukturierte Oberfläche erreicht werden, z.B. ein Schachbrettmuster aus hydrophilen (z.B. OH-Endgruppen) und hydrophoben (CH₃-Endgruppen) Bereichen. Es wurde auch versucht, sog. Oberflächenimprinting in Self-Assembly-Schichten durchzuführen. Dieses Verfahren ist vom "Molecular Imprinting" abgeleitet, das normalerweise als eine molekulare Prägung während einer Polymerisation eines stark quervernetzten Kunstharzes realisiert wird. In diesem Fall ist jedoch das Zermahlen, Sieben und Extrahieren des Polymers notwendig, um zu einem funktionsfähigen MIP (molecularly imprinted polymer) zu kommen. Das Oberflächenimprinting wird nur 2-dimensional durchgeführt. MIPs können unter Umständen ähnliche Eigenschaften wie Antikörper oder andere Bindungsproteine aufweisen, die Affinitäten zu den entsprechenden Analyten sind oft beachtlich. Eine Anwendung auf multidimensionale "Biochips" steht aber noch aus.

2.7 Paralleler Affinitätssensor-Array (PASA)

2.7.1 Konzept

Auf den ersten Blick scheint diese Bezeichnung in sich redundant zu sein, da ja Arrays immer eine parallele Struktur darstellen. Die Bezeichnung bezieht sich aber auf unterschiedliche Dimensionen – parallel hat hier eine zeitliche Bedeutung, Array bezieht sich auf die Multianalytfähigkeit. Ein PASA unterscheidet sich daher grundsätzlich von einem Array, der durch sequentielles Sammeln von analytischen Daten gewonnen wird. Als Affinitätssensor werden Systeme verstanden, die die Bindung eines Analyten an eine selektive Komponente nutzt – jedoch ohne den Analyten zu "verbrauchen". Daher sind Affinitätssensoren im Gegensatz zu enzymatischen (oder allgemeiner katalytischen) Sensoren zu sehen. Unter Affinitätssensoren sind meist, aber nicht ausschließlich, Antikörper-basierende Systeme zu verstehen. Enzymatische Sensoren benutzen eine enzymatische Selektivität zur Analytik, so z.B. Glucose-Sensoren, die auf Glucoseoxidase basieren. Die Anwesenheit eines Enzyms in einem System läßt keineswegs sofort auf einen enzymatischen Sensor schließen, so benutzen auch viele Affinitätssensoren Enzyme als Markierung – jedoch nicht um direkt mit dem Analyten in Wechselwirkung zu treten.

Der Parallele Affinitätssensor-Array (PASA) beruht auf einer konsequenten Parallelisierung aller Assayschritte. Dies ermöglicht es, ohne Nachteile einen extremen Parallelisierungsgrad zu erreichen – der analog zum Äquivalent in der Informatik² *Massively Parallel Analysis* genannt werden könnte. Aus der Literatur sind einige Versuche bekannt, Immunoassays bzw. Immunsensoren zu parallelisieren bzw. multianalytfähig zu machen. Die heute zwar triviale, trotzdem unerreicht erfolgreichste Parallelisierung ist die Verwendung einer sog. Mikrotiterplatte (MTP), einer meist aus Polystyrol bestehenden Einheit, die aus 96 einzelnen Kavitäten mit einem Volumen von ca. 350 μ L besteht. Der Übergang von einzelnen Teströhrchen zu Mikrotiterplatten hat zu einer erheblichen Durchsatzsteigerung und damit sicher nicht unerheblich zum Gesamterfolg der immunologischen Verfahren insgesamt beigetragen.

Auch chemische Synthesen oder biologische Assays werden auf MTP durchgeführt. High-Throughput-Screening (HTS) oder Ultra-High-Throughput-

²Massively Parallel Computing

Screening (UHTS) sind ohne MTP-ähnliche Systeme kaum denkbar. Die 96-er-(8x12)-Platte wurde inzwischen durch die 384-er-(16x24)-Platte und sogar durch die 1536-er-(32x48)-Platte ergänzt. Es muß erwähnt werden, daß die Erhöhung der Kavitätenanzahl hier durch eine immer feinere Aufteilung der Kavitäten erreicht wird, die Grundfläche ("footprint") bleibt immer gleich, was die Verwendung von standardisierten Geräten erleichtert. Das Kavitätenvolumen einer 384-er-Platte beträgt nur noch ca. 100 μL , das einer 1536-er-MTP sogar nur noch 10 μL . Halbkommerziell sind inzwischen auch sog. Nanotiterplatten erhältlich, die auf der Basis von geätzttem Silizium hergestellt werden. Deren Volumen hat einen Bereich von 50 nL erreicht – das ist der 7000ste Teil des Volumens einer Kavität einer Standardmikrotiterplatte. Leider hat diese Miniaturisierung auch ihre Schattenseiten, so verdunstet der Inhalt einer Nanotiterplatte unter normalen Bedingungen schon innerhalb weniger Sekunden, was besondere Maßnahmen, z.B. das Überschichten mit Öl erfordert. Auch ist das Pipettieren nur noch mit speziellen Nanopumpen (z.B. Piezopumpen) möglich, Waschschrte sind sehr schwierig und werden daher vermieden. Ein publiziertes System basiert daher auf der Verwendung eines homogenen Immunoassays (Energietransfer-Mechanismus, FRET). Es ist aber offensichtlich, daß das Abarbeiten von z.B. 1536 Kavitäten ein gewisses zeitliches Problem darstellt und dadurch starke Diskrepanzen zwischen den Kavitäten auftreten können.

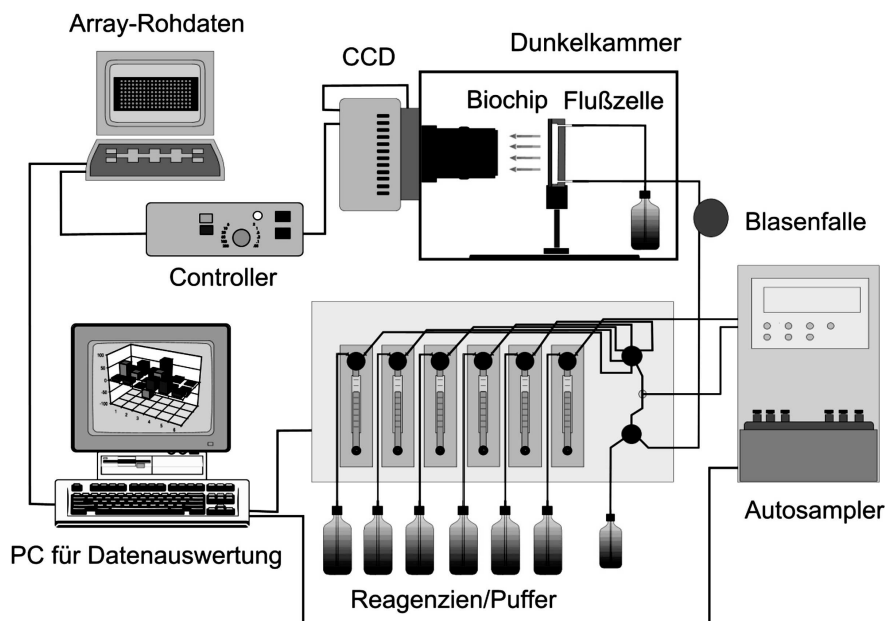


Abbildung 2.4: Paralleler Affinitätssensorarray (PASA) – schematischer Aufbau des automatisierten Systems

Ein PASA beruht jedoch auf einem komplementären Konzept (Abb. 2.4). Während das MTP-Format – welcher Art auch immer – eine Prozessierung vieler Proben zum Ziel hat, die alle auf einen einzelnen Parameter untersucht werden sollen, soll im Grenzfall in einem PASA nur eine Einzelprobe untersucht

werden, diese aber auf viele – Hunderte oder Tausende – Parameter in einem Analysenvorgang. Besonders die analytisch weitgehend unlösbare Aufgabe, eine komplette Liste aller Inhaltsstoffe einer unbekannt Probe zu erstellen, stellt eine in der Praxis gar nicht so seltene “Anforderung“ dar. Häufig wird in diesen Fällen aus der Historie der Probe oder aus anderen Randbedingungen eine relativ willkürliche Auswahl der zu bestimmenden Parameter getroffen. Es ist offensichtlich, daß diese Auswahl das komplette Versagen der Analyse verursachen kann. Diese auf einem “educated guess“ basierte Auswahl ist analytisch gesehen, extrem unbefriedigend. Doch meist existiert eine strenge Korrelation zwischen den Kosten und der Anzahl der bestimmten Parameter. Dies führt oft zu einer ungeeignet geringen Anzahl an Analysenparametern. Diese Korrelation wird mittels eines PASA durchbrochen. Es besteht nur noch ein sehr schwacher Zusammenhang zwischen der Anzahl zu untersuchender Analyten und den Gesamtkosten der Analyse. In Abbildung 2.4 wird der grundlegende Aufbau eines PASA-Prototypen dargestellt. Das System besteht in erster Linie aus einer Dunkelkammer, in der eine Durchflußküvette installiert ist. Eine Wand der Küvette ist austauschbar und besteht aus dem eigentlichen Biochip. Dieser basiert auf einem oberflächenmodifizierten Glasplättchen, das in einem 2-dimensionalen Muster die betreffenden biochemischen Reagenzien trägt. Die Detektion wird über eine enzymverstärkte Chemilumineszenz erreicht. Das Chemilumineszenzlicht verläßt die Flußzelle und wird mit Hilfe eines Linsensystems auf einen CCD-Chip fokussiert.

2.7.2 Chemilumineszenz

Neben markierungsfreien, fluoreszenzmarkierten und enzymverstärkten Systemen gibt es zahllose andere Verfahren, wie ein Immunoassay bzw. Biosensor eine nicht direkt meßbare Konzentration in ein Signal verwandeln kann. Auf die Vor- und Nachteile aller nicht auf Chemilumineszenz basierenden Systeme kann hier nicht eingegangen werden, auch wenn die meisten Verfahren durchaus ihre speziellen Vorzüge aufweisen. Chemilumineszenz und enzymverstärkte Chemilumineszenz³ zeigt jedoch besonders im Zusammenhang mit multidimensionalen Assays seine Stärken. Da die Lichtemission auf chemische Energie zurückgeht, ist eine weitere Lichtquelle z.B. zur Anregung bzw. Absorptionsmessung nicht notwendig. Dies vereinfacht den Aufbau eines PASA-Systems erheblich. Auch wird die Lichtemission parallel durch Füllen der Flußkammer mit Substrat ausgelöst und muß nicht sequentiell ausgelesen werden. Die parallel leuchtenden Spots können mit einem einzigen CCD-Bild detektiert werden. Die zeitliche Integration, die viel zur Empfindlichkeit des Verfahrens beiträgt, wird direkt *on-chip* durchgeführt.

Chemisch gesehen sind nur wenige chemilumineszierende Verbindungen bzw. Substrate für eine Anwendung in einem Biosensor oder Immunoassay geeignet. Dies ist in erster Linie durch die hohe Sensitivität limitiert, die bei den meisten Assays erreicht werden soll. Dies legt es nahe, Verbindungen zu bevorzugen, die eine hohe Quantenausbeute aufweisen – im Idealfall soll jedes Molekül ein Lichtquant erzeugen (Quantenausbeute 100%). Hier sind biolumineszierende Systeme den chemischen Systemen deutlich überlegen. So erzeugt die Glühwürmchen-Luciferase durch Oxidation des entsprechenden Luciferins eine Licht-

³Biolumineszenz sei in diesem Kontext mit eingeschlossen.

temission mit einer Quantenausbeute von nahezu 90% [38]. Chemische Systeme überschreiten selten einmal 1%. Nun fragt man sich, warum nicht bevorzugt Luciferasen als Markierungen eingesetzt werden. Dies hat in erster Linie mit der Instabilität dieser Enzyme zu tun. So nimmt die Aktivität der Glühwürmchen-Luciferase bei Raumtemperatur sehr schnell ab, so daß eine Verwendung bei Immunoassays kaum in Frage kommt.

Verwendet man chemische Systeme, so sind wasserfreie organische Lösungsmittel eine bevorzugte Matrix. Die Gruppe der Peroxyoxalate [39] werden z.B. in Leuchtstäben für Notfälle (Schiffbrüchige etc.) verwendet und haben für ein chemisches System eine sehr hohe Quantenausbeute. Leider ließ sich dieses System bisher nicht in wäßrige Medien übertragen und ist daher weitgehend inkompatibel mit Immunoassays. Dagegen werden Acridiniumester häufig in Immunsensoren bzw. automatisierten Immunoassays eingesetzt. Acridiniumester sind als aktivierte Ester (NHS-Ester) kommerziell erhältlich und sind in Form eines Kits einfach für Kopplungsreaktionen verwendbar. Diesen Systemen fehlt aber der enzymatische Verstärkungsschritt, so daß gewisse Empfindlichkeitseinbußen in Kauf genommen werden müssen. Ähnlich eingesetzt werden Isoluminol-Derivate, die gleichfalls über einen Spacer an ein Protein oder Hapten gekoppelt werden können. Auch sie haben keinen enzymatischen Verstärkungsschritt. Bei diesen chemisch getriggerten Lumineszenzreaktionen sind oft die Bedingungen nicht mild genug, um eine Zerstörung von biochemischen Komponenten (z.B. Antikörpern) zu vermeiden. Daher werden diese Systeme häufiger in nicht-regenerierbaren Assays eingesetzt.

Am empfindlichsten in dieser Reihe sind enzymatisch katalysierte Systeme. Theoretisch könnte man auch sog. Enzymkaskaden einsetzen, um die Sensitivität weiter zu steigern, bisher stehen aber solche Systeme nicht zur Verfügung. Der Vorteil der enzymatischen Systeme ist die Tatsache, daß pro Markierung nicht nur ein Lichtquant erzeugt werden kann, sondern dieser Zyklus vielfach durchlaufen werden kann, bevor das Enzym deaktiviert wird oder die Reaktion aus Zeitgründen abgebrochen wird. Es sind eine ganze Reihe von enzymatisch katalysierten Chemilumineszenzreaktionen beschrieben worden [40, 41]. Interessanterweise fehlt aber ein direkter Empfindlichkeitsvergleich in der Literatur noch immer – so ist nicht klar, welches System (als Nachweisgrenze der Markierung gerechnet) überlegen ist. Bei den vorhandenen Vergleichen werden nicht selten unfaire Kombinationen gegenübergestellt. Es deuten aber alle Daten darauf hin, daß Chemilumineszenz-Markierungen nicht so empfindlich sind, wie oft beteuert wird. Die extrem empfindliche chromogene Detektion (HRP/TMB/H₂O₂) ist mit einer Nachweisgrenze von $2 \cdot 10^{-15}$ mol/L Peroxidase (HRP) [42] oft deutlich empfindlicher als das Chemilumineszenz-Pendant. Dies deutet darauf hin, daß man sich auch von sehr guten Chemilumineszenzsubstraten keine Wunder erwarten darf. Das wohl aktuellste Substrat basiert auf der Adamantylidioxiran-Chemie [43]. Der sterisch stabilisierte 4-Ring kann mittels einer erhöhten Elektronendichte destabilisiert werden, was zum Zerfall unter Aussendung eines Photons führt. Die Quantenausbeute in Wasser ist nicht besonders hoch (ca. 0.001%), kann aber durch „Enhancer“ gesteigert werden (auf ca. 0.5%). Als Enhancer werden u.a. kationische Tenside (z.B. Cetyltrimethylammoniumbromid, CTAB) verwendet. Besonders effektiv ist der Zusatz von Polymeren mit kovalent angekoppelten Fluorophoren [44]. Hier vermutet man einen Energietransfermechanismus – die Emission findet letztlich mit hoher Quantenausbeute vom Fluorophor aus, auch mit der entsprechenden Wellenlänge, statt. Die Adaman-

tyldioxiran-Systeme unterscheiden sich in zweifacher Hinsicht. Die Einführung verschiedener Substituenten beeinflusst die Stabilität des Rings und kann daher zur Steuerung der Emissionskinetik verwendet werden. Die Einführung enzymatisch spaltbarer Gruppen ermöglicht die Verwendung des Substrats für unterschiedliche Enzyme, so wird ein Phenylphosphat-Rest leicht von Alkalischer Phosphatase gespalten, ein Galactose-Rest von β -Galactosidase usw. Sogar ein chemischer Trigger wurde eingebaut – Fluorid-Ionen können unter relativ milden Bedingungen die *t*-BuMe₂-Silylschutzgruppe abspalten, das entstehende Phenolat-Anion führt dann zum Zerfall des Dioxetans. Limitierend sind heute noch die hohen Kosten, die Dioxetan-Reagenzien verursachen⁴. Bevor nicht – wie schon oben erwähnt – ein signifikanter Vorteil bestimmter Systeme nachgewiesen ist, wird sich deren Einsatz kaum rechtfertigen lassen. Gleichfalls kommerziell verfügbar sind Substrate auf der Basis von Acridiniumestern⁵. Auch hier gilt der Hinweis, daß ein direkter Vergleich der relevanten System noch aussteht und daher keine abschließende Wertung möglich ist.

Das am weitesten verbreitete enzymatisch katalysierte Chemilumineszenzsystem basiert auf HRP, Luminol und Wasserstoffperoxid – oft auch mit dem Zusatz von “Enhancern“, wie *p*-Iodphenol oder Biphenylboronsäure. Auch über diese Systeme sind nur unzureichende Daten verfügbar. Erschwerend kommt hinzu, daß die Eigenschaften dieser Substrate kritisch von der Reinheit der Reagenzien und dem Zusatz von (oft als Firmengeheimnis gehandhabten) “Enhancern“ abhängen. Die Firma Pierce hat in den letzten Jahren regelmäßig neue bzw. verbesserte Luminolsubstrate auf den Markt gebracht. Obwohl offensichtlich große Unterschiede zwischen diesen Varianten bestehen, ist unklar, wie sich diese Unterschiede auf ein Immunoassay- bzw. Biochip-System auswirken. Auch hier wirkt sich die Patentsituation auf die Kosten aus, so daß ein Kompromiß zwischen Leistung und Preis⁶ gesucht werden muß. Negativ an den Luminol-Systemen ist die Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, was zur ungewollten Oxidation von Proteinen und damit deren Inaktivierung führen kann. Dies ist besonders relevant für Systeme, die regeneriert werden sollen/müssen. Technisch bedeutsam ist die emittierte Wellenlänge, da davon abhängt, welcher CCD-Typ verwendet werden muß. 415 nm gilt für CCDs schon als kurze Wellenlänge (siehe nächster Abschnitt). Der Mechanismus der “Enhancer“ ist noch nicht völlig geklärt, es wird aber angenommen, daß der “Enhancer“ ein optimiertes Primärsubstrat darstellt, das erst in einem weiteren Redoxschritt seine Oxidationsäquivalente auf das Luminol überträgt. Bei den Luminol-Enhancern tritt in der Regel keine Wellenlängenverschiebung auf. Dies deutet darauf hin, daß die emittierende Spezies mit und ohne “Enhancer“ identisch ist. In der Praxis hat sich gezeigt, daß Luminolsubstrate ein schwaches “Vorleuchten“ zeigen können. Dies erhöht den Untergrund erheblich und wurde beim PASA über eine *on-line*-Vorinkubation gelöst.

⁴Tropix, Inc., Bedford, MA, USA (heute: PE Biosystems).

Die Kosten eines verstärkten Dioxetansubstrats für Alkalische Phosphatase betragen bis zu 2800 €/Liter bzw. 0.28 €/Kavität bzw. >25 €/Mikrotiterplatte.

⁵Lumigen, Inc., Southfield, MI, USA.

⁶*SuperSignal West Pico Substrate* (Luminol-basiert) kostet ca. 290 €/Liter, die nachweisstärkere Variante *Femto Maximum Sensitivity Substrate* kommt auf ca. 2800 €/Liter.

2.7.3 Detektoren

Für ein PASA-System ist ein CCD-Chip, ein charge-coupled device, als multidimensionaler optischer Detektor besonders geeignet. CCDs sind weit verbreitet, so in Videokameras oder den immer populärer werdenden Digitalkameras. Durch die hohen Stückzahlen ist ein rapider Preisverfall zu verzeichnen. Diese vor wenigen Jahren noch als teure Speziallösung angesehenen Detektoren werden in vielen neuen Bereichen eingesetzt. Zwar werden auch andere multidimensionale Detektoren (z.B. CMOS [45]) entwickelt, die preisgünstiger als CCDs sind, eine vergleichbare Sensitivität weisen sie aber nicht auf. Idealerweise werden für ein PASA-System sog. back-illuminated CCD-Chips eingesetzt, bei dem das Trägermaterial Silizium in einem Ätzprozeß bis auf eine Schicht von weniger als $15\ \mu\text{m}$ abgeätzt wird [46]. Der Chip wird dann "umgedreht" montiert, d.h. das Licht fällt durch die frühere Unterseite des Chips. Dies führt zu einer Erhöhung der Quantenausbeute auf bis zu 90%. Außerdem wird der CCD-Chip mittels einer kaskadierten Peltierkühlung auf ca. -40°C gekühlt (Luftkühlung), um das thermische Rauschen zu verringern. Dieser sog. Dunkelstrom führt dazu, daß bei ungekühlten CCDs schon nach wenigen Sekunden das Signal vom thermischen Rauschen bestimmt wird, die Pixel "laufen voll". Bei kurzen Belichtungszeiten, wie sie in der Videotechnik oder Fotografie üblich sind, spielt der Dunkelstrom nur eine untergeordnete Rolle. Die Kühlung erfordert auch eine hermetische Versiegelung der Kamera, da ansonsten Kondenswasser die Elektronik zerstört. Um eine optimale Kühlung zu erreichen, wird die Kamera oft auch evakuiert (thermische Isolierung). Bei vielen CCDs steht auch der sog. MPP-Modus⁷ zur Verfügung, der auf elektronischem Wege zu einer Verringerung des Dunkelstroms, aber auch zu einer Verringerung der Full-Well-Capacity⁸ führt.

Die Auflösung der Kamera (Anzahl der Pixel) spielt für Sensoranwendungen keine nennenswerte Rolle. Im Gegenteil, Kameras mit geringen Auflösungen haben i.d.R. größere Pixel, was die Lichtempfindlichkeit verbessert. Dieser Effekt kann noch zusätzlich verstärkt werden, in dem benachbarte Pixel nicht einzeln ausgelesen werden, sondern die Ladung *on-chip* vereinigt wird ("Binning"). Ein z.B. 3x3-Binning führt dazu, daß die Elektronen von 9 Pixeln vereinigt und gemeinsam vermessen werden. Die entstehenden Superpixel haben eine 3-fache Kantenlänge der üblichen Pixel – entsprechend verschlechtert sich die Auflösung des Bildes. Im Gegenzug erhöhen sich jedoch die Signale erheblich und auch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert sich. Dieser Effekt ist nicht gleichzusetzen mit einer rein softwareseitigen Mittelwertbildung der 9 Pixel. Einen Einfluß auf die Signalqualität hat auch die Digitalisierungsrate. Ein CCD-Chip besitzt mindestens einen Analog/Digital-Wandler (A/D-Wandler), der die analogen Spannungen an einem Chip-Ausgang in digitale Signale umwandelt. Je länger nun ein A/D-Wandler Zeit hat, ein digitales Signal zu erzeugen, umso genauer bzw. sicherer ist die Wandlung. Daher geht eine hohe Präzision mit einer geringen Digitalisierungsrate einher. Nicht zu verwechseln ist dies mit dem sog. Digitalisierungsfehler, der zwangsläufig auftritt und durch die notwendigerweise endliche Stufenhöhe eines A/D-Wandlers verursacht wird. So ist der Digitalisierungsfehler eines 8-bit-Chips wesentlich größer als der eines 16-bit-

⁷ *Multi-pinned phase*. Durch diese spezielle Technik werden Oberflächenladungen nicht gesammelt. Da der größte Anteil des Dunkelstroms an der Oberfläche entsteht, erhält man eine Reduktion des Dunkelstroms bis zu einem Faktor 500.

⁸Kapazität eines Pixels in Elektronen

Chips, der die analoge Spannung in feinere Bereiche aufteilt und daher genauer bestimmen kann. Ein wichtiger Parameter ist auch die sog. Full-Well-Capacity. Dies beschreibt die Anzahl der Elektronen, die in einem Pixel gehalten werden können, ohne daß dieses "überläuft". In den meisten CCDs führt dies zum Verschmieren des Bilds, da die benachbarten Pixel mit Elektronen "kontaminiert" werden. Dies kann mit speziellen Ableitungssystemen (sog. Anti-Blooming) verhindert werden. Da Sensoren fast nie mit zu hohen Signalen konfrontiert werden und Anti-Blooming-Systeme die Quantenausbeute verschlechtern, werden diese für hochsensitive CCDs nicht eingesetzt.

Auf grundsätzlich andere Weise kann die Empfindlichkeit einer CCD-Kamera durch ein Verstärkersystem erhöht werden. In den meisten Fällen handelt es sich um ein sog. Multichannel-Plate-(MCP)-System. Der aus vielen parallelen Kanälen aufgebaute Verstärker ähnelt in seiner Arbeitsweise einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV). MCPs können in zwei grundsätzlich verschiedenen Modi betrieben werden, in einem Proportional-Mode, bei dem die am Ende ankommende Ladung ungefähr proportional der einfallenden Lichtmenge ist, und dem Photon-Counting-Mode, bei dem ein Photon in einer gewissen Wahrscheinlichkeit eine Elektronenlawine erzeugt, die mittels eines Diskriminators gezählt wird. Letzterer Modus wird u.a. durch Anlegen einer sehr hohen Spannung am MCP erreicht. Im Photon-Counting-Mode können einzelne Photonen-Ereignisse gezählt werden. Daher ist dieser Modus besonders empfindlich. Höhere Lichtintensitäten können aber nicht genau vermessen werden, da der Zählfehler durch die Überlagerung von Signalen und dem Einfluß der Totzeit immer größer wird. Auch der Proportionalmodus hat seine Nachteile. So ist die Kennlinie trotz des Namens keineswegs so linear, wie bei einer unverstärkten CCD. Zudem können MCPs durch zu hohe Lichtintensitäten (einfallendes Tageslicht) leicht geschädigt werden. Letztendlich sind MCP-Systeme sehr teuer, benötigen eine Hochspannungsversorgung und haben nur eine begrenzte Lebensdauer. Vorteilhaft kann sein, daß kein Shutter (Verschluß) benötigt wird, da die MCP selbst als Shutter wirkt und sehr kurze Belichtungszeiten erreicht werden können.

Der Verschluß einer konventionellen CCD-Kamera ist ein etwas anfälliges Bauteil, da es bewegliche Verschleißteile enthält. Um die Verwendung eines Verschlusses zu vermeiden, gibt es mehrere Lösungsmöglichkeiten. Eine sehr elegante Möglichkeit sind sog. Interline-CCDs. Bei diesen CCDs ist jede zweite Pixelspalte lichtdicht abgedeckt. Somit können die Ladungsbilder mit einem Pixeltakt unter diese Reihe geschoben und ungestört ausgelesen werden. Logischerweise verursacht dieses System durch die abgedeckten Spalten eine Verschlechterung der Quantenausbeute, sofern dies nicht mit besonderen Maßnahmen (Mikrolinsenarrays) ausgeglichen wird. Kann durch entsprechende Maßnahmen erreicht werden, daß die Lichtemission des Objekts während der Auslesephase der Kamera unterbunden wird, kann auf einen Verschluß ggf. ganz verzichtet werden. Hält die Lichtemission während des Auslesens an, so verschmieren die Signale räumlich. Die Kopplung von CCDs an andere optische Systeme kann entweder mit Linsen oder faseroptischen Systemen durchgeführt werden. Ersteres hat Vorteile in Hinblick auf Kosten, Flexibilität und Kühlung (bessere thermische Isolierung). Faseroptiken haben oft höhere Transmissionsfaktoren, eine kompaktere Bauweise und benötigen oft keinerlei Justierung. Diese Diskussion soll auch aufzeigen, daß es sehr schwierig ist, zwei CCD-Systeme sinnvoll zu vergleichen, wenn nicht die genauen Randbedingungen des Vergleichs und die geplanten An-

wendungsbereiche bekannt sind. Neuerdings sind auch digitale Kameras auf dem Markt, die auf CMOS-Technologie beruhen. CMOS-Sensoren sind einfach herzustellen, daher preisgünstig und haben einen geringen Stromverbrauch. Interessant ist auch die Eigenschaft, daß sich einzelne Pixel unabhängig voneinander auslesen lassen. Auch der dynamische Bereich ist größer als bei CCDs. Da die Lichtempfindlichkeit von CMOS-Sensoren jedoch noch deutlich geringer ist als die von CCDs, werden sie in der optischen Biosensorik noch kaum eingesetzt.

2.7.4 Optik

Obwohl ein PASA-System nur eine minimale Optikausstattung benötigt, ist ein gänzlicher Verzicht nicht möglich. So gehört schon der Biochip zur Optik hinzu, falls die übliche Konfiguration genutzt wird, die Lichtintensität durch den Chip hindurch zu messen. Somit sollten die Biochips zumindest grundlegenden optischen Standards entsprechen, so Schlierenfreiheit, geringe Absorption bei den untersuchten Wellenlängen, nur wenige Streuzentren und eine optisch glatte Oberfläche. Diese Voraussetzungen werden von Mikroskopie-Objektträgern ausreichend erfüllt, was deren Beliebtheit als Träger für Biochips teilweise erklärt. Da Chemilumineszenzlicht in der Regel nicht gerichtet ist, benötigt man noch ein optisch abbildendes System, um einen Teil des emittierten Lichts auf den CCD-Chip, den Detektor, zu fokussieren. Zu diesem Zweck eignen sich besonders klassische Linsen bzw. Linsensysteme. Als problematisch hat sich jedoch herausgestellt, daß das Abbildungsverhältnis nahe 1:1 liegt. Dies erschwert den Bau von licht- und kontraststarken Planoptiken erheblich, so daß gewisse Kompromisse in optischer Hinsicht eingegangen werden müssen. Als brauchbare Kombination hat sich ein Standardobjektiv einer Kleinbildspiegelreflexkamera mit einem Öffnungsverhältnis von 1:1.4 und einer Brennweite von 50 mm zusammen mit einem Zwischenring von 36 mm herausgestellt. Andere Varianten, die für solche Zwecke gelegentlich empfohlen werden, wie eine Kombination zweier Standardobjektive in einer Retroanordnung, zeigten starke Bildfehler, wie Vignettierung (Randabschattung) und Bildfeldkrümmung. Auch bei der ersteren Kombination ist eine geringe Bildfeldkrümmung vorhanden, die aber für die Anwendung keine signifikanten Auswirkungen hat. Versucht man jedoch längere Zwischenringe zu verwenden, so nimmt sowohl die Lichtstärke zu sehr ab, als auch die Bildfeldkrümmung zu sehr zu. Nun möchte man einwenden, daß für derartige Anwendungen eine Faseroptik (faseroptische Platte oder ein Taper) ideal wäre. Dies ist in gewisser Hinsicht natürlich richtig. Es gibt aber drei entscheidende Nachteile, die gegen die Verwendung von faseroptischen Bauteilen sprechen, die beide mit den entsprechenden Interfaces zu tun haben. Der erste Nachteil ist die mangelnde Flexibilität. Die meisten faseroptischen Anschlüsse sind irreversibel mit der CCD-Kamera verklebt. Ein Austausch ist kaum möglich. Diese Verklebung führt auch dazu, daß die Vakuumisolierung der Kamera eine Wärmebrücke bekommt, die die Kühlung des CCD-Chips stört. An der anderen Seite der Faseroptik ist natürlich keine Verklebung möglich. Da hier zwischen Faser und Leuchtpot mindestens die Dicke des Objektträgers liegt, ist kein enger Kontakt zwischen dem Faserende und dem Leuchtobjekt herstellbar. Da optische Fasern normalerweise einen sehr großen Öffnungswinkel aufweisen, führt ein derartiger Abstand zu einer enormen Verschlechterung der Bildschärfe bzw. zu einer optischen Überlagerung mehrerer Spots. Da die Faseroptik eine ununterbrochene Verbindung zwischen CCD und Meßkammer herstellt, ist auch die

Verwendung eines Shutters weitgehend ausgeschlossen. Trotzdem würden Faser-optiken signifikante Vorteile bieten: Sie sind räumlich wesentlich kompakter, die Lichtstärke ist meist höher und eine 1:1-Abbildung ist perfekt ohne Verzerrungen und Vignettierungen möglich.

2.7.5 Flüssigkeitssystem (Liquid Handling)

Es stehen zahllose Typen von Flüssigkeitspumpen für die Verwendung in analytischen Geräten zur Verfügung. Häufig werden Kolbenpumpen (z.B. "HPLC-Pumpen") verwendet, da sie sehr hohe Drücke und sehr reproduzierbare Flüsse erzeugen können und wenig anfällig sind. Nachteilig ist ihre erhebliche Größe und der hohe Preis. Auch sind derartige Pumpen etwas problematisch bei der Verwendung von salzhaltigen Lösungen (Puffern), die gerade im Biosensorbereich vorherrschen. Auskristallisierende Puffersalze können eine Kolbenpumpe schnell zerstören. Die mobile Phase muß partikelfrei sein, da ansonsten die Kolbenfläche zerkratzt würde oder Ventile nicht mehr richtig schließen. Die vorwiegend verwendeten Werkstoffe (Edelstahl) sind empfindlich gegenüber halogenidhaltigen Lösungen und geben gewisse Mengen an Metallionen an das Laufmittel ab. Einige biochemische Reagenzien werden durch Metallionen sehr effizient inhibiert. Daher sind für biochemische Anwendungen oft sog. "metallfreie" Systeme erforderlich.

Oft werden auch die sehr günstigen und flexibel einsetzbaren Schlauchpumpen verwendet, die – sofern ein resistentes Schlauchmaterial verwendet werden kann – auch chemisch relativ aggressive Lösungen pumpen können. Der Salz- und Partikelgehalt spielt kaum eine Rolle. Sollte der Schlauch doch langsam angegriffen werden, so kann er kostengünstig ausgetauscht werden. Bedauerlicherweise ist es um die Flußgenauigkeit der Schlauchpumpen nicht so gut bestellt. So ist die Richtigkeit des angestrebten Flusses meist fraglich und auch zeitlich gibt es erhebliche Veränderungen, da die Flexibilität des Schlauches mit der Zeit variiert (Alterung).

Eine häufig anzutreffende Alternative sind sog. Spritzenpumpen, die als Niederdruck-Kolbenpumpen angesehen werden können. Die erreichbaren Drücke sind zwar niedriger als die von HPLC-Pumpen, dafür sind sie korrosionsfester und wesentlich preisgünstiger. In der üblichen Konfiguration sind sie aber nicht in der Lage, einen konstanten Volumenstrom über sehr lange Zeit zu halten, da die Spritzenpumpen in regelmäßigen Abständen neue Flüssigkeit aufziehen müssen und dann den Strom unterbrechen. Große Anstrengungen werden unternommen, sog. Mikropumpen auf den Markt zu bringen. Abgesehen von den schon erwähnten miniaturisierten Pumpen in Tintenstrahl Druckern ist der Markt noch sehr überschaubar. Problematisch ist oft die Robustheit und Lebensdauer einer Mikropumpe. Entsprechende Systeme werden z.B. von GeSiM, dem Forschungszentrum Karlsruhe (IMT), Hydraulik Nord Parchim, dem Institut für Mikrotechnik Mainz und anderen angeboten. Der Vollständigkeit halber soll auch das elektrokinetische Pumpen erwähnt werden, das in miniaturisierten Analysenchips⁹ Anwendung findet. In diesem Fall kann man auf eine dezidierte Pumpe völlig verzichten. Der Flüssigkeitstransport wird nur durch das Anlegen einer (relativ hohen) Spannung erreicht.

⁹Auch *Lab-on-a-chip* genannt. Kürzlich wurde ein *Lab-on-a-chip*-System von Agilent Technologies (ehemals Hewlett-Packard) für die Nucleinsäureanalyse kommerzialisiert.

Elektrokinetische Systeme nutzen den sog. elektroendosmotischen Effekt, der in hohem Maße von Oberflächenladungen der Kanalwand abhängt. Vorteilhaft ist in diesem Fall, daß eine Pfropfströmung erzeugt wird, ganz im Gegensatz zu den üblichen parabolischen Flußprofilen, die alle anderen Pumpen verursachen. Durch eine Pfropfströmung wird Rückvermischung sehr stark vermindert. Dies wird mit Erfolg z.B. in der elektrokinetischen Chromatographie eingesetzt, die eine extrem hohe Trennleistung erreichen kann. Auf die unterschiedlichen Techniken, die in Flüssigkeitsventilen eingesetzt werden, soll hier nicht genauer eingegangen werden. Bei Ventilen ist der Druckbereich, die Schaltzeit, Korrosions- und Partikelfestigkeit und Zuverlässigkeit entscheidend. Auch die Verschleppung bzw. das Leaking von Reagenzien muß berücksichtigt werden.

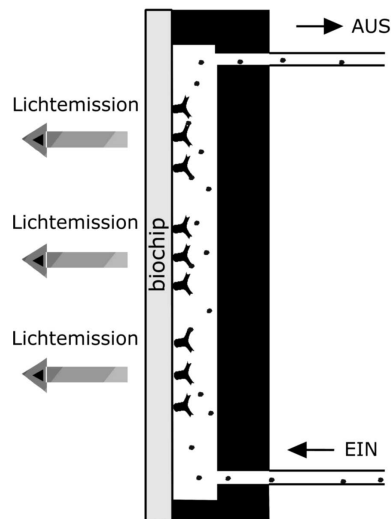


Abbildung 2.5: Schemazeichnung einer PASA-Flußzelle mit austauschbarem Biochip

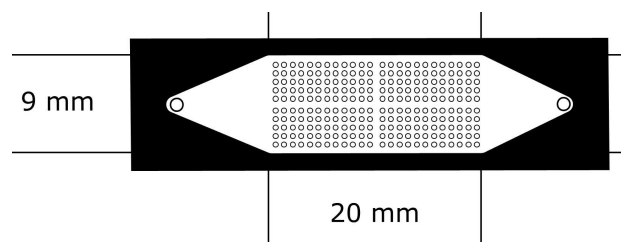


Abbildung 2.6: Typische Abmessungen einer PASA-Flußzelle mit Biochip

Im hier gezeigten PASA-System wurde zusätzlich ein Autosampler für die Flüssigkeitschromatographie eingesetzt. Somit können auch eine größere Anzahl von Proben automatisiert abgearbeitet werden. Die Handhabung des Gesamtsystems ist daher einer HPLC-Anlage nicht unähnlich. Die Flußzelle und Dunkelkammer sind Kernbausteine eines PASA-Systems (siehe Abb. 2.5 und 2.6). Auf die Dunkelkammer soll hier nicht genauer eingegangen werden, da es hier unzählige, fast willkürliche Variationen gibt, die jedoch nur die Größe und das Gewicht, jedoch nicht die Leistung der Anlage beeinflussen. Es muß jedoch gewährleistet sein, daß kein Licht von außen in die Dunkelkammer gelangt, was bei den erreichbaren Sensitivitäten durchaus nicht trivial ist.

Problematisch sind alle Öffnungen nach außen, so der Deckel der Dunkelkammer, und besonders die Schlauchverbindungen. So kann ein luft- oder flüssigkeitsgefüllter Teflonschlauch als sehr effektiver Lichtleiter (analog zu einer Glasfaser) wirken. Die Flußzelle ist als ein kritisches Bauteil einzustufen. Kommerziell erhältliche Flußzellen sind hydrodynamisch ungünstig konstruiert, da am Zulauf der Flüssigkeit meist ein 90° -Winkel zu überwinden ist und zudem ein Abriß der laminaren Strömung an zu steilen Wandwinkeln zu befürchten ist. Auch die geringe Dicke der Flußzelle macht Probleme. Da nach HAGEN-POISEUILLE der Fluß mit r^4 vom Radius eines Rohres abhängt (analoges gilt für parallele Platten), hat eine kleine Veränderung der Schichtdicke der Zelle eine sehr große Auswirkung auf den Fluß. Daher sind an die Parallelität der Flußzellenwände sehr hohe Ansprüche zu stellen. Zudem darf es keine Toträume geben, die von der Zellendurchmischung weitgehend ausgeschlossen sind. Dies würde zu einer inakzeptablen Verschleppung von Reagenzien führen.

Eine ungünstige Hydrodynamik kann allgemein zu einer unreproduzierbaren Strömung in der Kammer führen, was sich letztlich in unreproduzierbaren Meßwerten niederschlägt. Eine wichtige Entscheidung betrifft auch die Orientierung der Kammer relativ zum Detektor. In der einfacheren Variante wird durch den Biochip hindurch gemessen. Der Chip muß im verwendeten Wellenlängenbereich¹⁰ optisch durchlässig sein. Dies ist offensichtlich z.B. bei goldbeschichteten Chips nicht der Fall. Hier muß eine umgekehrte Orientierung verwendet werden und zusätzlich muß die dem Chip gegenüberliegende Flußzellenwand aus Glas oder einem anderen transparenten Material bestehen. Ein bisher nur unbefriedigend gelöstes Problem sind auch die notwendigen Dichtungen. Relativ einfach zu realisieren sind die Anschlüsse der Schläuche, da hier auf Standardfittings aus dem Chromatographiebereich zurückgegriffen werden kann. Schwierig ist jedoch die Abdichtung des Biochips selbst, da es sich um eine großflächige und unregelmäßig geformte Dichtung handelt. Da die Flußzellenabmessungen nicht variieren sollen, ist der Flexibilität der Dichtung Grenzen gesetzt. Umgekehrt sind zu harte Dichtungen nur schwer dicht zu bekommen. Es kann auch nicht beliebiger Druck angewendet werden, da der Biochip sonst bricht. Dichtungen müssen außerdem eine hohe chemische Resistenz aufweisen, da gelegentlich auch aggressive Flüssigkeiten gepumpt werden. Unangenehm kann auch die unspezifische Bindung (NSB) auffallen, da besonders weiche oder poröse Dichtungswerkstoffe z.B. Peroxidase-markierte Reagenzien entweder auf der Oberfläche adsorbiert werden können oder wie von einem Schwamm aufgesogen werden. In einem nachfolgenden Substratschritt führt dies zu störender Lichtemission. Außerdem

¹⁰Bei einem Peroxidase/Luminol/Wasserstoffperoxid-System werden Photonen einer Wellenlänge von ca. 415 nm emittiert (breite Verteilung).

muß die leichte Handhabung beachtet werden, da ein zu kompliziert abzdichtendes System den Chipwechsel zu sehr behindert. Momentan steht noch keine Flußzelle zur Verfügung, die allen Bedingungen gleichermaßen entspricht.

2.7.6 Miniaturisierung

Ein PASA-System bringt schon von der Konzeption hervorragende Voraussetzungen für eine Miniaturisierung mit. Alle Hauptkomponenten sind flächig angeordnet und sind einer Herstellung im Format von Halbleiterkomponenten zugänglich. Auch das Liquid-Handling kann in die Miniaturisierung einbezogen werden, wenn Mikropumpen und Mikroventile verwendet werden. Schon heute stehen einige miniaturisierte Komponenten kommerziell zur Verfügung. Die Miniaturisierung der Biochips bzw. der darauf immobilisierten Strukturen ist momentan in keinem Fall limitierend, da schon jetzt ohne Probleme > 1000 Spots/cm² hergestellt werden können. Eine Steigerung auf > 10.000 Spots/cm² dürfte in Kürze erreichbar sein. Erst die Miniaturisierung kann das volle Potential eines PASA-Systems ausschöpfen. Bedenkt man die sehr geringen laufenden Kosten, die dann pro Messung anfallen¹¹ und die bescheidenen Investitionskosten, die für ein miniaturisiertes PASA-System benötigt werden, kann man durchaus einen erheblichen Einfluß auf die zukünftige Analytik in verschiedensten Bereichen prognostizieren.

2.7.7 Biofilme

Ein stark vernachlässigtes Thema im Bereich der Immunsensoren ist das Auftreten von Biofilmen. Biofilme treten meist unangenehm in Erscheinung, so auch in diesem Umfeld. Problematisch ist hier, daß vorwiegend "biokompatible" Laufmittel bzw. Reagenzien verwendet werden – im Gegensatz z.B. zur HPLC. Dies führt dazu, daß weitgehend alle flüssigkeitsbenetzten Oberflächen nach kurzer Zeit mit einem Biofilm bewachsen werden. Neben unerwünschten Enzymaktivitäten (z.B. Proteasen), die von Biofilmen ins Medium abgegeben werden, tritt auch eine unerwünschte Verengung der Flußkanäle auf, die bis zur Verstopfung führen kann. Besonders unangenehm ist das unregelmäßige Ablösen von Biofilm-Stücken, die sich in anderen Teilen der Anlage wieder ablagern können. Die Bekämpfung von Biofilmen ist ein technologisch sehr wichtiges Problem – leider gibt es keine Patentlösung. Sehr effizient ist z.B. der Zusatz von 1% Natriumazid. Nachteilig ist jedoch die sehr hohe Humantoxizität und die starke Inhibitionswirkung auf Meerrettichperoxidase, eines der wichtigsten Markerenzyme überhaupt. Verwendet werden auch Wasserstoffperoxid, Natronlauge, Methanol und andere Lösungsmittel. Leider ist auch deren Einsatzbereich eingeschränkt. Die Entfernung eines Biofilms ist schwierig und wird z.B. enzymatisch (Pepsin/HCl) versucht. In schwierigen Fällen hilft nur der Komplettaustausch aller Teile.

2.7.8 Entgasung

Wie in den meisten Flüssigkeitssystemen ist das Auftreten von Luftblasen äußerst unerwünscht. Leider ist das komplette Füllen des Systems mit Flüssig-

¹¹Nach einer vorläufigen Schätzung könnte eine Messung für ca. 1 € durchgeführt werden. Pro gemessener Parameter würde dies Kosten von weit unter 1 Cent bedeuten.

keit keine Garantie, daß dies auch so bleibt. Nachteilig wirkt sich hier aus, daß viele Gase eine erhebliche Löslichkeit in Wasser aufweisen, die jedoch stark temperatur- und druckabhängig ist. Jede Temperatur- oder Druckänderung im System birgt nun die Gefahr in sich, daß sich bisher gelöstes Gas in Form von Gasblasen abscheidet. Dem kann in verschiedener Weise entgegengewirkt werden. Am effektivsten ist die Entgasung aller Flüssigkeitsströme, z.B. mit einem *on-line*-Entgaser, mit Helium¹² oder im Vakuum. Leider ist dies mit erheblichem Aufwand verbunden und aus technischen Gründen oft schwer möglich. Eine weitere Option ist die Verwendung einer Blasenfalle, die entstandene Luftblasen einfängt und das Gas nach außen leitet. Wesentlich für die Diskussion der Gasproblematik ist die Planung der Pumpeninstallation. Verwendet man Pumpen hinter der Meßzelle im Saugmodus, so herrscht im System meist Unterdruck, was die Entstehung von Gasblasen stark fördert. Auch kleinste Undichtigkeiten führen hier zum Eindringen von Luft. Betreibt man die Pumpen jedoch im Druckmodus, so vermindert der Überdruck das Ausgasen beträchtlich. Undichtigkeiten machen sich zwar als austretende Flüssigkeit bemerkbar, nicht jedoch als eindringende Luft.

2.7.9 Steuerung

Auch auf dieses Thema kann nicht in der gebührenden Tiefe eingegangen werden. Die Bedeutung der Gerätesteuerung ist jedoch nicht zu unterschätzen. Die Zuverlässigkeit des Biosensor-Systems hängt nicht unwesentlich von der Art der Gerätesteuerung ab. Viele Gerätekomponenten können über eine serielle Schnittstelle (RS-232) angesprochen werden. Der entsprechende Anschluß an einen handelsüblichen Personal-Computer (PC) stellt in der Regel kein Problem dar. Obwohl RS-232-Schnittstellen nicht sehr schnell sind, werden sie aufgrund ihrer hohen Kompatibilität und Robustheit sehr häufig eingesetzt. Problematisch ist in diesem Zusammenhang die Steuerung und das Auslesen der CCD-Kamera. Die Datenmenge übersteigt das von einer RS-232-Schnittstelle Bewältigbare doch erheblich. Daher muß die CCD-Kamera oft mit einem proprietären Interface angesprochen werden, was die Integration erheblich verkompliziert. In Fall des ersten PASA-Prototypen entschied man sich deshalb zur Verwendung von zwei getrennten PCs, um Wechselwirkungen der CCD-Steuerung mit der Systemsteuerung zu vermeiden. PCs unter Microsoft Windows Betriebssystemen sind nur begrenzt multitaskingfähig und daher blockieren leistungshungrige Programme oft andere. Ein exakt zeitgesteuerter Ablauf ist somit relativ schwierig zu gewährleisten. Die Systemsteuerung wurde bei dem genannten Sensor mit Hilfe des Programmpakets Delphi (Borland) realisiert. Zusätzlich wurde das Programm Async Professional installiert, um die Schnittstellenprogrammierung zu erleichtern. Als Betriebssystem wurde Windows NT 3.51 eingesetzt. Die Kamerasteuerung (auf einem zweiten PC, Windows 3.11) wurde mit dem Programm WinView 1.6.2 bewerkstelligt, das vom Kamerahersteller geliefert wurde. Die Rohdaten wurden an den Systemrechner übertragen (ASCII-Format) und dort weiterverarbeitet.

¹²Helium ist in Wasser relativ schlecht löslich (8.6 cm³/kg gegenüber 23.2 cm³/kg bei Stickstoff). Beim Durchleiten von Helium durch eine Flüssigkeit werden die anderen Gase "ausgetrieben", ohne daß sich im Gegenzug viel Helium löst.

2.7.10 Kalibrierung

Ein kritisches Thema eines multidimensionalen Sensors ist seine Kalibrierung. Auch wenn es gelegentlich schon in der Literatur empfohlen wurde, so ist die Kalibrierung eines n -dimensionalen Analyt-Konzentrationsraums aus praktischen Erwägungen kaum möglich. So steigt der Kalibrieraufwand mit steigendem n sehr stark an. Jede neue Substanz würde die Messung von mindestens $x \cdot n$ zusätzlichen Kalibrierkurven erfordern, wobei x die Anzahl der zu untersuchenden Konzentrationsstufen angibt. Ohne eine praktikable Lösung dieses Kalibrierproblems würden multidimensionale Systeme viel von ihrer Eleganz verlieren. Aufgrund der relativen Neuheit von massiv parallelen Analysensystemen ist das damit zusammenhängende Kalibrierproblem noch nicht erschöpfend untersucht worden. Es kann hier noch ein erhebliches Optimierungspotential vermutet werden. Hier sollen nur ein paar grundlegende Lösungsansätze skizziert werden, die zeigen, daß der scheinbar enorme Kalibrieraufwand auf ein erträgliches Maß reduziert werden kann. Es soll auf die im Grundlagen-Kapitel erläuterten Unterschiede diverser multidimensionaler Systeme verwiesen werden.

Der pseudo-multidimensionale Array (*Unabhängiger Array*) ist am einfachsten zu behandeln. Es reichen im kompetitiven Fall schon zwei Messungen für eine Minimalkalibrierung aus. Dies hängt damit zusammen, daß die verschiedenen Assays unabhängig voneinander ablaufen. Daher ist es möglich, eine Kalibrierlösung mit allen Analyten herzustellen. Nimmt man eine der Theorie entsprechende Kalibrierkurvenform und einen vernachlässigbaren Untergrund an, so sind zwei Messungen ausreichend, um den gesamten Chip zu kalibrieren. Idealerweise würden die gewählten Konzentrationen einer Nullprobe (Blank, höchstes Signal) und einer Probe entsprechen, bei der die Konzentrationen der Analyten ungefähr deren Testmittelpunkt (Wendepunkt, siehe Gleichung 2.1) entspricht. Aus diesen Daten kann eine komplette Kalibrierkurve rekonstruiert werden.

Der Fall der echten Multianalytfähigkeit (*Abhängiger Array*) ist schon schwieriger zu handhaben. Hier beeinflussen sich die Kalibriersubstanzen gegenseitig. Daher ist eine Mischung nur begrenzt möglich. Definiert man Subarrays, die sich gegenseitig nicht beeinflussen, so ist das Verfahren der pseudo-multidimensionalen Systeme direkt anwendbar. Idealerweise verwendet man nur einen Enzymtracer und einen Kalibrator pro Subarray. Die Kreuzreaktionen werden jeweils als bekannt vorausgesetzt. Es konnte experimentell gezeigt werden, daß sich Kreuzreaktionen von monoklonalen Antikörpern sehr gut reproduzieren lassen [47] und als Systemkonstante angesehen werden können. Sollten sich Subarrays weder als unabhängig von bestimmten Spots noch als sinnvoll gemeinsam kalibrierbar herausstellen, so muß der Kalibrieraufwand erhöht werden. Die gruppenselektiven Arrays müssen in kompatible Subarrays aufgeteilt werden, die sequentiell kalibriert werden. Natürlich eröffnet jeder zusätzliche Kalibrierschritt alle Möglichkeiten des Analytmischens, die auch bei pseudo-multidimensionalen Assays bestehen. Sollte eine sequentielle Abarbeitung des Kalibrierprogramms unerwünscht sein, so kann auch eine Aufteilung der Meßkammer von Vorteil sein, auch wenn dies die Präzision ggf. negativ beeinflußt und den technischen Aufwand erhöht.

2.7.11 Qualitätssicherung

Ein erheblicher Vorteil von Biochip-basierten Systemen ist die problemlose Integration von Qualitätskontrollen. Als erste Stufe der Kontrolle ist die Verwendung von einer erheblichen Anzahl von Replikaten in Form von multiplen Spots gleichartiger Beschichtung zu sehen. In konventionellen Immunoassays werden aus Kostengründen oft überhaupt keine Replikate verwendet ($n = 1$) oder sogar Proben gepoolt. Die hohe Anzahl der Replikate ermöglicht es ohne Anwender-eingriff statistische Kenngrößen zu ermitteln und daher die Zuverlässigkeit einer Aussage zu bewerten. Doch damit sind die Möglichkeiten eines Multianalysystems noch nicht erschöpft. So können zahlreiche Spots aufgebracht werden, die z.B. für eine aktuelle Zustandskontrolle des Chips, einer internen Kalibrierung, für Plausibilitätskontrollen, Probenverfälschungskontrollen, Kontrolle der grundlegenden Funktionsfähigkeit des Chips und aller Reagenzlösungen usw. geeignet sind. Hiermit kann eine hohe Qualität der Daten unabhängig von der Erfahrung des Anwenders gewährleistet werden. Sogar Probennahmefehler könnten bis zu einem gewissen Grad erkannt werden.

2.7.12 Auswertung

Obwohl die Chemometrie schon als traditioneller Anwendungsbereich der Analytik gelten kann, steckt die Auswertung multidimensionaler Immunoassays bzw. Biosensoren noch in den Kinderschuhen. Besonders die Datenverarbeitung hochparalleler Array-Systeme ist noch wenig entwickelt. Es wurden zwar schon einzelne Ansätze veröffentlicht [48, 49, 50, 51], trotzdem gelingt es nur partiell, die entsprechenden Meßdaten adäquat zu verarbeiten. Den wenigsten ist es bewußt, daß Kalibrierkurven von multidimensionalen Immunoassays nicht einfach additiv sind¹³, sondern ein gekoppeltes Gleichungssystem darstellen. Mathematisch erschwerend kommt hinzu, daß die Kalibrierfunktionen keine Geraden darstellen und die Verwendung von nichtlinearen Gleichungen erfordert. Soweit das heute beurteilbar ist, sind die entstehenden Gleichungssysteme nicht mehr exakt lösbar und erfordern numerische Verfahren zu deren Lösung. Eine genaue mathematische Behandlung dieser Problematik steht jedoch noch aus.

Häufiger wurden bisher Neuronale Netze zur Verarbeitung von mehrdimensionalen Immunoassay-Daten verwendet. Jedoch waren die Ergebnisse bisher noch nicht völlig überzeugend. Möglicherweise liegt das an der zu hohen Anzahl an Freiheitsgraden, die in einem Neuronalen Netz vorhanden sind. Dies würde folglich einen enormen Kalibrieraufwand erfordern, der mit der Größe des Arrays sehr stark zunimmt. Zudem wird das analytische Vorwissen in einem Neuronalen Netz weder explizit noch implizit genutzt. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß sich in entsprechenden Systemen die Meßfehler ungünstig akkumulieren und damit die Genauigkeit des Ergebnisses leidet. Es wurden auch multidimensionale Kalibrierkurven definiert, die von der eindimensionalen, sog. 4-parametrischen Gleichung abgeleitet wurden.

¹³Der Trivialfall von n unabhängigen Assays, die n Resultate liefern, können wie n eindimensionale Fälle behandelt werden.

Die 4-parametrische Gleichung (Gleichung 2.1) ist eine semiempirische Gleichung zur Auswertung von Immunoassays:

$$Y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B} + D \quad (2.1)$$

Die Funktion ergibt eine sigmoidale Kurve in einem halblogarithmischen Plot. Vorteilhaft gegenüber anderen Kalibrierfunktionen ist die Tatsache, daß die vier Parameter (A , B , C und D) alle eine offensichtliche Bedeutung haben und daher auch leicht geschätzt werden können, was z.B. zur Gewinnung von Startparametern einer Fit-Prozedur von großem Vorteil ist. A entspricht dem maximalen Signal, D dem minimalen Signal (Blank), C dem Testmittelpunkt oder Wendepunkt der Kurve und B der Steigung im Wendepunkt. Besonders der Testmittelpunkt C hat eine charakteristische Bedeutung in der Immunoassaytechnologie und ist eng mit der Empfindlichkeit des Tests verknüpft.

Es konnte gezeigt werden, daß unter definierten Bedingungen der Testmittelpunkt C sogar direkt in eine Affinitätskonstante (bzw. Gleichgewichtskonstante) umgerechnet werden kann. Es ist schon lange bekannt, daß kompetitive Immunoassays fast immer affinitätslimitiert¹⁴ in ihren Nachweisgrenzen sind. Das bedeutet, daß solche Immunoassays unter optimierten Bedingungen eine konstante untere Nachweisgrenze besitzen, die durch die Affinitätskonstante (Analyt/Antikörper) festgelegt wird (z.B. [52]). Eine Verbesserung der Nachweisgrenze kann unter diesen Randbedingungen nur mit einem Antikörper höherer Affinität oder einem geringeren Meßfehler erreicht werden. Da letzterer meist geräteseitig festliegt, ist in der Praxis nur die Verwendung besserer Antikörper erfolgreich. Kompetitive Immunoassays werden bei kleinen Analyten (Haptene) eingesetzt, die nur eine "Bindungsstelle" (Epitop) für den Antikörper anbieten. Es wurden auch Verfahren entwickelt, diese Limitierung zu umgehen (siehe auch [53, 54, 55, 56, 57]). Es konnte jedoch bisher nicht bewiesen werden, daß sich der notwendige Aufwand lohnt, da direkte Vergleiche entsprechender Assays noch ausstehen.

Erstaunlicherweise gibt es bislang kaum Publikationen, die das Verhalten von kreuzreagierenden Analytengemischen systematisch untersucht haben. Es wurden einige weitgehend empirische Arbeiten veröffentlicht, die aber nicht die Frage beantworten konnten, ob die Mischung von Analyten mathematisch beherrscht werden kann und welchen Gesetzmäßigkeiten diese unterliegen.

Einfacher ist die Situation bei der Identifikation von Einzelstoffen, die von einem Standardimmunoassay gleichfalls nicht geleistet werden kann, sofern nicht nur eine bindende Spezies vorkommen kann. Hier können verschiedene Varianten einer Mustererkennung (*Pattern Recognition*) eingesetzt werden. Erstmals wurde von SCHNEIDER et al. gezeigt [17], daß eine Unterscheidung von zwei Analyten mit Hilfe von zwei Antikörpern möglich ist. Störsubstanzen, die entweder eine sehr geringe Kreuzreaktion (CR) aufweisen, oder im Vergleich zur relevanten Hauptkomponente in geringer Konzentration vorkommen, können hier vernachlässigt werden. Genaugenommen ist nicht die Konzentration, sondern das Produkt aus CR und molarer Konzentration des Begleitstoffs maßgeblich. Die Hauptkomponente darf dann wie eine Reinsubstanz behandelt werden. Es konnte gezeigt werden, daß mit der Methode der minimierten quadratischen Abwei-

¹⁴Voraussetzung: Label ist empfindlich genug nachweisbar.

chung eine sehr gute Prognose der relevanten Hauptkomponente gelingt. Erstmals konnte dies für Triazinherbizide bei Konzentrationen am Grenzwert der Trinkwasserverordnung demonstriert werden [25]. In dieser Arbeit wurden auch Meßwerte berücksichtigt, die außerhalb des engeren Meßbereichs lagen, aber für die Analytidentifizierung signifikante Informationen enthalten. Es muß betont werden, daß die Angabe einer Kreuzreaktion zu einer (relativen) Affinitätskonstante äquivalent ist. Die häufig anzutreffende Methode, über Kreuzreaktionen eine Gesamtinhibition einer Realprobe mit mehreren relevanten Komponenten hochzurechnen, ist nur im Trivialfall (eine dominierende Komponente) erlaubt. Kreuzreaktionen sind nur für 1-Komponenten-Lösungen definiert (und gemessen worden) und sagen nichts über das Verhalten in einer Mischung aus. Viele Diskussionen über scheinbar "abweichende" Immunoassayergebnisse lassen sich wenigstens teilweise darauf zurückführen. Eine mathematische Vorschrift zur Behandlung von Mischungen in Immunoassays steht bis heute aus. Die leichte Verfügbarkeit erheblicher Rechenleistung moderner PCs führt dazu, daß auch aufwendige Auswerteverfahren (z.B. numerisches Lösen von Gleichungssystemen) routinemäßig durchgeführt werden können. Daher ist mit einer erheblichen Weiterentwicklung der Auswerteverfahren in der Zukunft zu rechnen. Das entsprechende Potential wurde bisher nur zu einem kleinen Teil genutzt. Es muß aber auch betont werden, daß nur durch den computergestützten Einsatz komplexer Auswertelgorithmen ein System, wie es der PASA darstellt, praktikabel wird. Die Datenmenge, die ein Biochip-basiertes System liefert, kann kaum mehr sinnvoll manuell ausgewertet werden.

2.7.13 Regeneration

Ein besonders kompliziertes Thema im Bezug auf Biosensoren ist deren Regeneration. Obwohl schon einige diesbezügliche Literatur existiert, ist der Wissensstand mehr als lückenhaft. Durch weitgehend empirische Vorgehensweisen wurden ein paar brauchbare Verfahren entwickelt. Eine theoretische Durchdringung des Themas fehlt aber fast völlig.

Besonders im Bereich der Flow-injection-Immunoassays (FIIA) hat sich die Regeneration auf der Basis von Protein A¹⁵ aus *Staphylococcus aureus* auf breiter Front durchgesetzt. Dies hängt damit zusammen, daß Protein A mit Immunglobulinen vieler Spezies und Klassen Komplexe mäßiger Stabilität bildet, fest genug, um einen Assay durchzuführen, schwach genug, um eine milde Regeneration mit leicht sauren Puffern zuzulassen. Als Vor- und gleichzeitig Nachteil muß gesehen werden, daß bei jedem Zyklus der immobilisierte Antikörper komplett verloren geht und neu beschichtet werden muß. Dies ist ein zeitlicher Nachteil und erhöht die Kosten. Vorteilhaft ist jedoch, daß für jeden Assay eine "frische" Schicht an Antikörpern zur Verfügung steht und die Regenerierungsbedingungen nur wenig von Antikörper zu Antikörper differieren. Damit ist auch der Optimierungsbedarf relativ gering. Für multidimensionale Assays auf Biochips ist das Verfahren nur wenig geeignet, da nach der Elution der Antikörper die räumliche Struktur des Chips zerstört ist. Eine weitere häufig anzutreffende Variante ist die kovalente oder adsorptive Immobilisierung der Antikörper, z.B. auf einer Säule. In diesem Fall muß wirklich die Antikörper/Antigen-Bindung aufgebrochen werden. Problematisch ist hier die oft

¹⁵Auch Protein G, Protein L u.ä. sind geeignet.

wesentlich höhere Affinität im Vergleich zum Protein-A-System. Dies erfordert meist energischere Bedingungen (z.B. niedrigerer pH-Wert) und eine genaue Optimierung des Systems, um eine Denaturierung des Antikörpers zu vermeiden. Bei einigen Antikörper/Antigen-Paaren ist auch keine Regeneration möglich, ohne den Antikörper zu denaturieren. In diesem Fall hilft die Verwendung eines weniger affinen Antikörpers, auch wenn das Sensitivitätseinbußen zur Folge haben kann. In einigen Publikationen wurde angeregt, daß Antikörper hergestellt werden sollten, die eine hohe Affinitätskonstante bei gleichzeitig hoher Dissoziationskonstante (leichtere Regeneration) besitzen. Nach heutigem Wissensstand erscheint dieses Ziel thermodynamisch nicht erreichbar zu sein. Berücksichtigt man, daß Affinitätskonstante, kinetische Assoziationskonstante und kinetische Dissoziationskonstante bei reversiblen Systemen streng gekoppelt sind, so erkennt man, daß eine Erhöhung der Dissoziationskonstante unweigerlich zu einer Erniedrigung der Affinitätskonstante führt, wenn nicht gleichzeitig die Assoziationskonstante erhöht wird. Da letztere aber meist diffusionslimitiert ist und nur von der Viskosität des Mediums und der Größe des diffundierenden Moleküls abhängt, stehen keine sinnvollen Steuerungsparameter in dieser Richtung zur Verfügung.

Optimiert man nun die Dissoziation über den pH-Wert der Regenerationslösung, so erkennt man bald einen äußerst kritischen Zielkonflikt bei der Anwendung auf einen Multianalyt-Chip. Die große Anzahl verschiedener Antikörper macht weitgehend alle Chancen einer erfolgreichen Regeneration zunichte, da empfindliche Antikörper schon bei wenig sauren pH-Werten denaturiert werden und gleichzeitig hochaffine Antikörper nur bei wesentlich niedrigeren pH-Werten erfolgreich regeneriert werden können. Bei indirekten Haptenimmunoassays (siehe Abb. 1.2) tritt das Problem in dieser Form nicht auf. Hier werden kleine Moleküle (Haptene) entweder direkt kovalent oder adsorptiv (als Konjugat) auf die Chip-Oberfläche gebracht. Es wird die Bindung bzw. Inhibition der Bindung des selektiven Antikörpers an das Hapten gemessen. Nach dem Assay muß der Antikörper von der Oberfläche wieder entfernt werden. Im Gegensatz zum direkten Assay darf das durchaus mit energischen Mitteln (verdünnte Säure, Proteasen) geschehen, da die immobilisierten Haptene meist viel robuster als ein Antikörper sind.

Um das Problem der direkten Assays (siehe Abb. 2.7) auf Biochips trotzdem zu lösen, wurde eine neuartige Regenerationsmethode entwickelt, die auf der Basis der enzymatischen Spaltung eines Spacer-Moleküls beruht ([58]). Dadurch gelingt die Regeneration auch bei milden Bedingungen, sogar bei pH 7. Alle bisher untersuchten Antikörper konnten unter identischen Bedingungen regeneriert werden.

2.7.14 Direkte Assays

Ein PASA (Paralleler Affinitätssensor-Array) wurde ursprünglich für die Anwendung im Trinkwasserbereich entwickelt¹⁶. Daher ist die überwiegende Anzahl der Beispiele an wasserchemischen Applikationen orientiert. Dies bedeutet nun keineswegs eine Limitierung des Systems auf die genannten Bereiche – die Auswahl der Anwendungen war projektbedingt.

¹⁶BMBF-Projekt 02 WU9573/3 "Development of fast multidimensional optical immunosensors for the detection of pollutants in water".

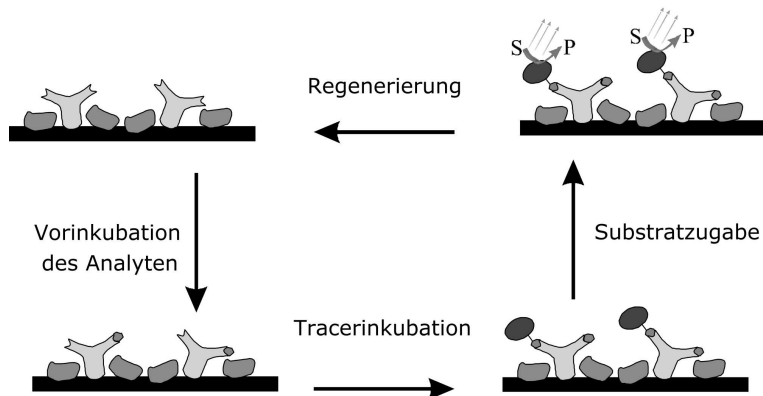


Abbildung 2.7: Allgemeiner Meßzyklus im direkten Assayformat mit Regeneration. Die Substratzugabe führt zum Einsetzen der Chemilumineszenz, deren Intensität mittels CCD-Detektor gemessen wird

Bei direkten Assays werden die Antikörper immobilisiert und zur Detektion ein Enzymtracer (Enzym-Hapten-Konjugat) verwendet. Die Beschichtung der Chips erfolgte analog zum Coating der Mikrotiterplatten durch adsorptive Immobilisierung auf einer hydrophoben Oberfläche. Um den Glaschip entsprechend zu modifizieren, wurde das gereinigte Glasplättchen (Objektträger) mit Trimethylchlorosilan behandelt. Da Antikörper auf diese Weise sehr einfach und stabil immobilisiert werden können, bringt eine kovalente Bindung kaum Vorteile – sie ist aber wesentlich aufwendiger. Dies ist wohl der Grund, warum sich im MTP-Bereich kovalente Kopplungen nicht durchsetzen konnten. Schwierigkeiten macht im direkten Format jedoch die Regeneration. Wie schon oben erwähnt, sind Assays im direkten Format weitgehend regenerationsresistent – es sind z.B. keine Publikationen bekannt (trotz Tausender Immunoassays in diesem Format), die eine erfolgreiche Regeneration über eine größere Anzahl von Cyclen hätte zeigen können. Unsere Hypothese, die auf früheren Arbeiten zu diesem Thema basiert [59], geht davon aus, daß weniger der Analyt, als der Enzymtracer die genannten Regenerationsprobleme aufwirft. So verhalten sich z.B. Fluoreszenztracer (z.B. Fluoresceinderivate) in dieser Hinsicht wesentlich unkritischer [60].

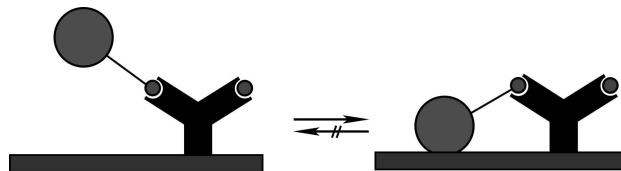


Abbildung 2.8: Möglicher Mechanismus der Enzymtracer-Adsorption an einer Oberfläche

Der vermutete Mechanismus ist in den Abb. 2.8 und 2.9 skizziert. So bindet nicht nur das Hapten an der Bindungsstelle des Antikörpers, sondern zusätz-

lich das Enzym über diverse Wechselwirkungen an der Oberfläche. Dies kann man auch als Alterungsprozeß auffassen. Betrachtet man nun den Gesamtkomplex, so erkennt man, daß es sich um einen multivalenten Komplex handelt, der bekanntermaßen sehr schwer dissoziiert [61] und dessen Bildung sogar als quasi-irreversibel angesehen werden kann. Auch wenn es gelingt, das Enzym zu denaturieren, so hilft das kaum weiter, da die betreffende Haptenbindungsstelle blockiert bleibt. Mit Regenerationsmitteln unterschiedlicher Stringenz kann auch mit erheblichem Optimierungsaufwand keine Lösung gefunden werden, da der Komplex zu stabil ist, daß er – ohne den Antikörper zu zerstören – dissoziierbar wäre.

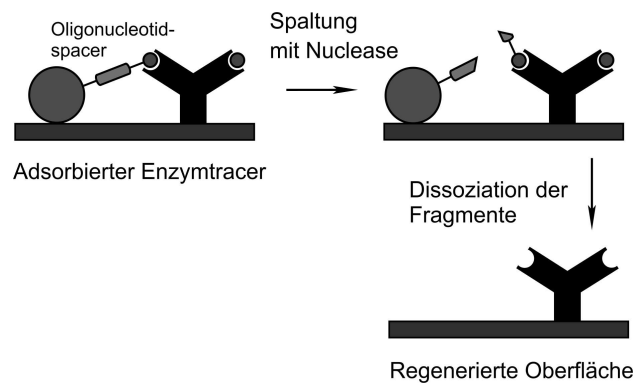


Abbildung 2.9: Regeneration mit enzymatisch spaltbarem Oligonucleotid-spacer. Die Spaltung kann mit einer unspezifischen Nuclease durchgeführt werden

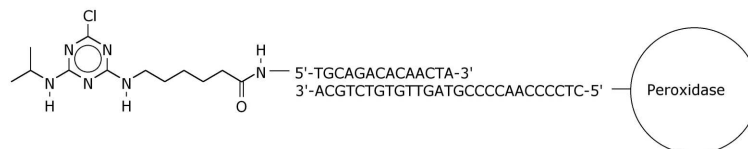


Abbildung 2.10: Peroxidasetracer mit enzymatisch spaltbarem Spacer. Der Tracer ist zur Detektion von Triazinherbiziden geeignet

Dieses Problem wurde mit einer neuartigen Methodik gelöst [58]. So wurde statt eines einfachen Kohlenwasserstoff-Spacers ein Oligonucleotid-Spacer synthetisiert (siehe Abb. 2.10). Dieser Spacer hat neben seiner Länge (geringe sterische Hinderung) auch den Vorteil, daß er enzymatisch spaltbar ist. Die verwendeten Nucleasen sind in hochreiner Form preisgünstig erhältlich. Auch der Einsatz eines erheblichen Überschusses an Nuclease führt aufgrund der erheblichen Substratspezifität nicht zu einem Angriff auf die beteiligten Proteine (besonders den Antikörper, dessen Aktivität erhalten bleiben soll). Die Spaltung des Spacers führt nun zur Bildung von monovalenten Komplexen, die leicht dissoziieren können. Erstaunlicherweise dissoziiert nicht nur der Hapten-Komplex, sondern auch das Enzym desorbiert weitgehend von der Oberfläche. Noch erstaunlicher ist die Tatsache, das in diesem Fall meist kein saurer Regenera-

tionspuffer mehr vonnöten ist, sondern auch neutraler Phosphatpuffer genügt. Unter diesen milden Bedingungen ist der Aktivitätserhalt fast aller Proteine gewährleistet.

2.7.15 Indirekte Assays

Indirekte, kompetitive Immunoassays beruhen auf der Immobilisierung von Haptene und einer Kompetition des Analyten mit den immobilisierten Haptene um die limitierten Bindungsstellen des Antikörpers. Durch zunehmende Analytkonzentrationen wird die Bindung des Antikörpers an die Haptene zunehmend inhibiert. Die Kalibrierkurven von direkten und indirekten Assays sind i.d.R. nicht unterscheidbar. Das heißt aber nicht, daß sich diese Formate immer gleich verhalten würden. Auch bei Immunochips mit indirektem Format wirkt sich positiv aus, daß die Markierung nicht direkt mit der Probe in Kontakt kommen muß. Dies ist besonders bei Enzymlabeln vorteilhaft. Da ein indirekter Immunochip kein immobilisiertes Protein aufweist (außer evtl. aufgebrachtem Blocking- bzw. Coating-Protein), ist dessen Stabilität wesentlich besser, als die eines direkten Chips mit immobilisierten Antikörpern, deren Denaturierung unter allen Umständen verhindert werden muß. Dies ermöglicht auch überlegene Regenerationsstrategien, die meist auf sauren Puffern und/oder Proteasen basieren. In Abb. 2.11 werden Regenerationscyclen eines indirekten Immunochips (mit immobilisierten Trinitrophenylderivaten) gezeigt. Über 100 Regenerationscyclen sind problemlos möglich, auch bis zu 1000 Cyclen erscheinen bei optimierter Oberflächenchemie erreichbar.

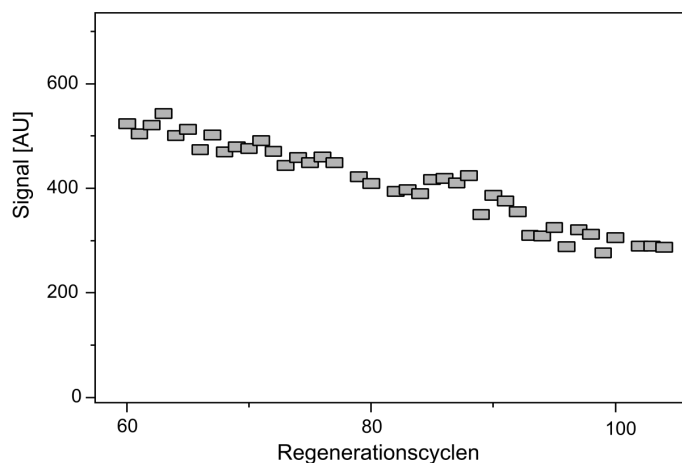


Abbildung 2.11: Wiederholte Regeneration eines indirekten PASA-Chips

Nachteilig an indirekten Formaten ist ihre limitierte Multianalytidentifizierung, da es schwierig ist, mehrere ähnliche Bindungsmoleküle zu verwenden. Meist ist es notwendig, daß jedes immobilisierte Hapten nur mit einem anwesenden Antikörper reagiert. Unter dieser Randbedingung ist jedoch ein fast unlimitiertes Wachstum des Arrays möglich. Dies führt zu einer hervorragenden Eignung für breite Screeningaufgaben und durch die gute Regenerierbarkeit für Quasi-online-Sensoren im Haptenbereich.

Kapitel 3

Immunologische Teststreifen

3.1 Teststreifensysteme

Es wurden schon zahlreiche Versuche publiziert, immunologische Teststreifen oder ähnliche Schnelltests zu entwickeln. Es sind sogar einige, vorwiegend medizinische Systeme, kommerziell erhältlich. Ziel solcher Systeme ist es meistens, einem ungeschulten Anwender leistungsfähige Analytik an die Hand zu geben und gleichzeitig eine richtige Interpretation sicherzustellen. Aufgrund dieser Zielgruppe ist es auch erforderlich, daß sowohl die Analysenkosten selbst relativ niedrig liegen, als auch nur geringe Investitionskosten notwendig sind. Zudem ist die Anwendung extrem einfach und robust zu gestalten. Es kann nicht davon ausgegangen werden, daß der Anwender analytische oder statistische Vorkenntnisse oder Erfahrungen besitzt. All diese Randbedingungen erzwingen zahlreiche Kompromisse und führen zu einer starken Einschränkung der möglichen Verfahren. Als beispielhaft in der Anwendung können Teststreifen zur Analyse von ionischen Bestandteilen in Wasser (z.B. Nitrat, Wasserhärte), zur Bestimmung von Blutzucker (enzymatische Tests) oder Teststreifen zur Bestimmung des pH-Werts angesehen werden. Diesen Tests gemeinsam sind jedoch die relativ bescheidenen Nachweisgrenzen, die eine Anwendung in der Ultrapurenanalytik in der Regel ausschließen. Ideal sind Tests, die keinerlei Reagenzienanwendung benötigen (pH-Streifen) und nicht kalibriert werden müssen. Ersteres erfordert oft eine komplexe Integration vieler Reagenzien in einem "trockenchemischen" System [62], letzteres eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Herstellungsbedingungen, um Qualitätsschwankungen weitgehend auszuschließen. Nicht selten wurden Teststreifensysteme publiziert, die einigen der o.g. Bedingungen nicht entsprochen haben. Dies führte zwangsläufig dazu, daß derartige Systeme niemals zum praktischen Einsatz kamen – meist war die Anwendung zu kompliziert und fehleranfällig. Derartige Systeme müssen mit den einfachsten bisher bekannten analytischen Verfahren konkurrieren können, oft sind dies z.B. Immunoassays auf Mikrotiterplattenbasis. MTP-Assays bieten zudem eine nicht zu unterschätzende Parallelisierung, die die Untersuchung auch größerer Probenanzahlen mit wenig Aufwand ermöglichen.

3.2 Homogene Immunoassays

Es gibt zwar keinen direkten Zusammenhang zwischen homogenen Immunoassays und Teststreifensystemen. Beachtet man aber die im vorherigen Abschnitt genannten Randbedingungen, so erkennt man schnell, daß Waschschriffe oder sequentielle Anwendung von Reagenzien unerwünscht sind. Gerade homogene Immunoassays haben den Vorzug, daß meist alle Reagenzien einfach zusammen gemischt werden. Auch die Probe ist in dieser Mischung enthalten. Der Transfer auf ein Teststreifenformat ist oft einfacher [63], weil homogene Tests nicht kritisch von der Immobilisierung einer Komponente abhängen – die Immobilisierung ist hier eher eine Option. Aufgrund dieser günstigen Voraussetzungen sollen hier die wichtigsten homogenen Assaytypen noch einmal vorgestellt werden.

3.2.1 EMIT

Der wohl bekannteste homogene Immunoassay ist das EMIT-System [64] (*enzyme multiplied immunoassay technique*) der Fa. *Syva* (heute: *Dade Behring*). Bei diesem homogenen Immunoassay wird die Aktivität des Markerenzym durch die Bindung eines Antikörpers moduliert. Dazu muß das Enzym (Glucose-6-phosphat-dehydrogenase) an ein Hapten gekoppelt werden. Bindet nun der Antikörper an das Hapten, so verringert er die Zugänglichkeit der Substratbindungstasche und verringert so den Enzymumsatz auf ein Minimum. Ist nun freier Analyt zugegen, so wird ein Teil des Antikörpers blockiert, der äquivalente Anteil des haptengekoppelten Enzyms bleibt frei. Dieser Anteil des Markerenzym zeigt die volle Aktivität. Somit steigt mit zunehmender Konzentration des Analyten die Enzymaktivität, die über eine Farbreaktion gemessen werden kann. Assays auf EMIT-Basis können sehr gut automatisiert werden und sind daher in der klinischen Analytik verbreitet. Die EMIT ist nur schlecht für die Analyse von großen Molekülen wie Proteinen geeignet, da in diesen Fällen die Bindungsstelle des Antikörpers zu weit von der Substratbindungsstelle entfernt ist. Dadurch ist der Modulationseffekt zu gering. Nachteilig an der EMIT ist auch die allgemein unvollständige Modulation der Enzymaktivität. Dies führt zu hohen Untergrundsignalen und relativ hohen Nachweisgrenzen.

3.2.2 SLFIA

Der SLFIA (*substrate labeled fluorescence immunoassay*) nutzt die Substrat-Markierung des Haptens. So wird z.B. ein Galactosylcoumarin-Hapten-Derivat bei Anwesenheit des passenden Antikörpers weitgehend von diesem gebunden und daher dem Substratumsatz entzogen. Bei Zusatz des entsprechenden Analyten wird wiederum ein Teil des Antikörpers blockiert und das Galactosylcoumarin-Derivat kann ungehindert durch Galactose in einen fluoreszierenden Coumarin-Farbstoff gespalten werden. Besonders nachteilig ist bei einem SLFIA, daß hier das Enzym nicht als Verstärker genutzt werden kann. Dies schränkt die Sensitivität des Systems stark ein.

3.2.3 CEDIA

Der CEDIA (*cloned enzyme donor immunoassay*) nutzt die Rekombination zweier Enzymfragmente zu einem aktiven Enzym. Die Fragmente der β -Galacto-

sidase wurden rekombinant hergestellt. Das kleinere Enzym-Donor-Fragment besteht aus 70-90 Aminosäuren, das größere Enzym-Akzeptor-Fragment aus über 900 Aminosäuren. Das kleine Donor-Fragment wird nun Hapten-modifiziert. Bindet nun ein passende Antikörper an das Hapten des Donor-Fragment, so wird die Rekombination der beiden Enzymteile behindert. Ist nun Analyt in der Lösung vorhanden, so wird ein Teil der Antikörperbindungsstellen blockiert. Eine äquivalente Menge an Donor-Fragmenten bleibt unkomplexiert und kann mit dem Akzeptor-Fragment rekombinieren und einen enzymatischen Umsatz katalysieren. Ein besonderer Vorteil des CEDIAs ist seine hohe Sensitivität.

3.2.4 FRET

Es ist auch möglich, homogene Immunoassays auf dem Prinzip des FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) aufzubauen. Kommen sich zwei Fluoreszenzfarbstoffe (Donor-Farbstoff, Akzeptor-Farbstoff) räumlich sehr nahe, so kann nach Anregung des Donor-Farbstoffs die Energie stahlungslos auf den Akzeptor-Farbstoff übertragen werden, der in der Folge fluoresziert [65, 66, 67]. Die normalerweise auftretende Fluoreszenz des Donor-Farbstoffes ist in diesem Fall gelöscht. Dieses System konnte erfolgreich in einer miniaturisierten Form in sog. Nanotiterplatten¹ eingesetzt werden. Nachteilig ist jedoch, daß sowohl der Antikörper als auch das Hapten markiert werden müssen.

3.2.5 EMMIA

Auch im EMMIA (*enzyme modulator mediated immunoassay*) wird eine Enzymaktivität moduliert – in diesem Fall mit Hilfe eines entsprechenden Enzyminhibitors. Der Inhibitor wird mit dem Hapten kovalent gekoppelt. Bei Anwesenheit des passenden Antikörpers wird das Inhibitor-Konjugat durch Komplexbildung gebunden. Die Enzymaktivität ist unbeeinflusst. Mit zunehmender Analytkonzentration jedoch bleibt immer mehr Inhibitor unkomplexiert und kann die Enzymaktivität reduzieren. EMMIAs wurden u.a. auf der Basis einer Acetylcholinesterase bzw. einer Pyruvatcarboxylase aufgebaut. Nachteilig an diesem Prinzip ist die Tatsache, daß das Signal (abhängig von der Enzymaktivität) umgekehrt proportional zur Analytkonzentration ist und daher eine negative Kalibrierkurvensteigung aufweist.

3.2.6 CLIA

Im CLIA (*cofactor labeled immunoassay*) werden Cofaktoren wie ATP oder NAD⁺ verwendet, die mit dem interessierenden Hapten modifiziert wurden. Es ist wichtig, daß durch diese Derivatisierung die Fähigkeit des Cofaktors am Enzym zu binden, nicht zu stark eingeschränkt werden darf. Bei Anwesenheit des entsprechenden Antikörpers wird das Hapten-Cofaktor-Konjugat gebunden und ist somit dem katalytischen Cyclus entzogen. Wird jedoch Analyt hinzugefügt, so bleibt ein entsprechender Teil des Derivats unkomplexiert und kann als Cofaktor funktionieren. Vorteilhaft ist hier im Gegensatz zu SLFIA, daß ein Verstärkungsfaktor auftritt, denn jedes Cofaktormolekül kann mehrfach umgesetzt werden.

¹Informationen unter <http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/infomat/lindau/>

3.2.7 ECIA

Beim *Enzyme-Channeling-Immunoassay* werden zwei voneinander abhängige Enzyme, wie z.B. Hexokinase und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase oder Glucoseoxidase und Peroxidase, verwendet. Im letzteren Fall werden Glucoseoxidase und der Antikörper immobilisiert. Die Immobilisierung ist nicht zwingend notwendig, daher kann das Verfahren trotzdem zu den homogenen Immunoassays gezählt werden. Das Hapten-Peroxidase-Konjugat befindet sich in Lösung. Ohne Analyt wird das Peroxidase-Konjugat an der Festphase vom Antikörper gebunden. Die Glucoseoxidase produziert nun aus Sauerstoff und Glucose Wasserstoffperoxid, das in direkter Nähe der Festphase freigesetzt wird. Befindet sich nun Peroxidase in unmittelbarer Nähe, so findet ein schneller Umsatz mit einem chromogenen Substrat zu einem Farbstoff statt. Wasserstoffperoxid in weiterer Entfernung zur Glucoseoxidase wird mit einem Zusatz von Katalase zerstört. Daher findet mit Peroxidase in weiterer Entfernung von der Oberfläche keine signifikante Reaktion statt. Der Zusatz von Analyt führt zu einer verminderten Peroxidasebindung und damit zu einem verminderten Umsatz. Eine Kalibrierung zeigt daher eine typische Inhibitionskurve mit negativer Steigung.

3.2.8 LIA

Es existieren eine größere Anzahl verschiedener LIAs (*liposome immunoassays*), die sich in ihrem Mechanismus unterscheiden. Nicht alle LIAs sind homogene Assays. Beim ELIA (*enzyme liposome immunoassay*) werden Liposomen mit Enzym (z.B. Meerrettichperoxidase) gefüllt und mit Hapten gekoppelt. Sind die anwesenden Antikörper mit Analyt gesättigt, so tritt keine Liposom-Lyse und damit auch keine enzymatische Farbreaktion auf. Bei abnehmender Antikörperkonzentration bindet immer mehr Antikörper an den Liposomen, die dadurch lysieren und das Enzym freisetzen. Abnehmende Analytkonzentration führt also hier zu zunehmenden Signalen. Ein ELIA kann als Kaskade angesehen werden, da ein multiples Label (Liposom) zu einer Freisetzung mehrfach reagierender Enzymmoleküle führt. Störend bei LIAs ist die relativ begrenzte Haltbarkeit der Liposomen, die zu einem konstanten Leaching des Enzyms und damit zu einem unvermeidlichen Untergrundsignal führt.

3.2.9 ARIS

Ein ARIS (*apoenzyme reactivation immunoassay system*, siehe Abb. 3.1), auch als ARIA (*apoenzyme reactivation immunoassay*) bezeichnet, basiert auf der Rekombination eines Apoenzyms mit der entsprechenden prosthetischen Gruppe, z.B. der Apo-Glucoseoxidase mit FAD (Flavin-adenin-dinucleotid). Da für diesen Assay die prosthetische Gruppe mit dem gewünschten Hapten kovalent verbunden sein muß, wird dieser homogene Immunoassay auch PGLIA (*prosthetic group labeled immunoassay*) genannt und kann mechanistisch als das Gegenstück zum EMMIA angesehen werden. Als besondere Vorteile des ARIS sind die positive Kalibrierkurvensteigung und die Nutzung der enzymatischen Amplifikation anzusehen.

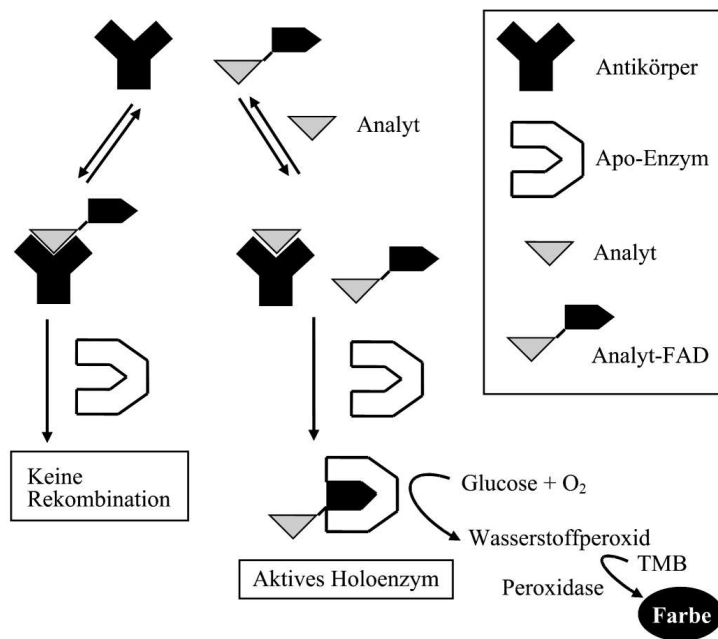


Abbildung 3.1: Grundprinzip des ARIS (*apoenzyme reactivation immunoassay system*)

3.2.10 AICREIA

Eine Variante des ARIS ist der AICREIA (*antibody-induced conformational restriction enzyme immunoassay*). In diesem Fall wird nicht die prosthetische Gruppe, sondern das Apoenzym mit dem gewünschten Hapten gekoppelt². Bindet nun ein Hapten-Antikörper an das Apoenzym-Konjugat, so tritt eine Konformationsänderung ein, die eine Rekombination mit der prosthetischen Gruppe nicht mehr zulässt. Fügt man zunehmende Konzentrationen des Analyten hinzu, so werden zunehmende Mengen des Antikörpers blockiert und es bleiben proportionale Mengen an Apoenzym übrig. Dieses rekombiniert ungehindert mit der prosthetischen Gruppe und führt zum Wiedererhalt der enzymatischen Aktivität, die z.B. mit einem chromogenen Substratsystem gemessen werden kann. Der AICREIA hat jedoch keine große Verbreitung gefunden.

²Genaugenommen wird das Holoenzym gekoppelt und anschließend in markiertes Apoenzym und prosthetische Gruppe gespalten.

3.3 Aufbau eines ARIS

3.3.1 Apoenzym

Eine entscheidende Komponente eines ARIS ist das verwendete Apoenzym. Weitaus am häufigsten wird Glucoseoxidase bzw. Apo-Glucoseoxidase (GOD, meist aus dem Schimmelpilz *Aspergillus niger*) eingesetzt [68]. GOD liegt als Homodimer mit einem Gesamt-molekulargewicht von 160.000 vor. Jede Untereinheit enthält ein Mol FAD. Glucoseoxidase oxidiert β -D-Glucose mit Hilfe von Sauerstoff zu δ -D-Gluconolacton und Wasserstoffperoxid. Letzteres wird mittels gekoppelter Enzymreaktionen in ein farbiges Produkt umgesetzt. Hierzu hat sich Meerrettichperoxidase und Tetramethylbenzidin bewährt. Jedoch wird auch die elektrochemische Detektion des Wasserstoffperoxids verwendet. Ein Glucose-Test auf der Basis der GOD war einer der ersten Teststreifen im klinischen Bereich [69]. Im Vergleich zu anderen Enzymen ist GOD sehr preisgünstig und in hoher Reinheit kommerziell erhältlich. Ein gewisses Problem können jedoch Spuren an Katalase sein, die in technischer GOD meist enthalten sind. Hierbei ist zu beachten, daß Katalase eine extrem hohe Enzymaktivität aufweist und daher schon in geringen Spuren relevant sein kann. Von SWOBODA [70, 71] wurden Bindungsstudien zu Apo-GOD durchgeführt, die wertvolle Hinweise für den Aufbau eines ARIS erbrachten.

Inzwischen ist sowohl die Primärstruktur, als auch eine röntgenkristallographische Struktur der GOD publiziert worden, die eine genauere Interpretation ermöglichen. Betrachtet man die 3-dimensionale Struktur der Glucoseoxidase [72, 73], so fällt auf, daß die prosthetische Gruppe fast vollständig vom Polypeptidteil des Enzyms abgeschirmt wird. ADP, ADP-Ribose und ATP führen zu einer Inhibition der Rekombination, nicht jedoch FMN, GDP, UDP und CDP. Dies zeigt, daß die Hauptwechselwirkung mit dem Apoenzym vom Adenosin-Teil ausgeht. Die Kristallstruktur kann hier sogar noch detaillierte Aussagen liefern. So sind vorwiegend Wasserstoffbrücken für die Wechselwirkung zwischen FAD und Apo-GOD verantwortlich. Diese Bindungen sind nicht unwesentlich für die Stabilisierung des Holoenzym verantwortlich.

Obwohl keine kovalente Bindung zwischen Apoenzym und prosthetischer Gruppe (FAD) vorhanden ist, ist die Bindung insgesamt extrem fest. So kann das FAD auch mit Dialyse nicht vom Apoenzym getrennt werden. Dies spricht für eine quasi-irreversible Bindung der prosthetischen Gruppe. Diese Einschätzung wird bestätigt, wenn man sich experimentelle Vorschriften zur Spaltung des Holoenzym betrachtet: So ist die Verwendung von Salzsäure/Glycerin (pH 1.4, 30% Glycerin) notwendig, um die prosthetische Gruppe aus der Bindungstasche zu lösen. Die endgültige Separation von FAD und Apoenzym erfordert i.d.R. chromatographische Verfahren. Normalerweise sollte die gelchromatographische Abtrennung von FAD und Apo-GOD keine Schwierigkeiten bereiten. In der Praxis treten aber verschiedene Probleme auf. So wird das Enzym bzw. Apoenzym bei den extrem niedrigen pH-Werten leicht denaturiert – dies vermindert die Ausbeute bzw. die Aktivität des rekombinierten Produkts. So muß die Trennung bei niedrigen Temperaturen und so schnell als möglich durchgeführt werden. Erschwerend kommt hinzu, daß ohne den Zusatz von Stabilisatoren, wie Glycerin oder Polymeren das Enzym quantitativ denaturiert wird. Der Zusatz von Glycerin erhöht aber die Viskosität des Mediums so stark, daß die chromatographische Effizienz leidet. Es hat sich gezeigt, daß die Viskositätserhöhung

sowohl für die Stabilisierung als auch für die Verschlechterung der Chromatographie verantwortlich sind. Daher ist es schwierig, diese beiden Effekte getrennt zu optimieren. Es scheinen aber auch zusätzliche Wechselwirkungen zwischen dem Polypeptid und FAD aufzutreten, die die Abtrennung des FAD behindern. Dies wird durch das Ergebnis gestützt, daß der Zusatz bestimmter Tenside die Trenneffizienz verbessern kann. Jedoch ist auch im optimierten Zustand der gelochromatographischen Trennungen mit starkem Fronting des FAD zu rechnen³. Dies führt dazu, daß die Trennung als nicht basisliniengetrennt anzusehen ist und eine signifikante Restaktivität des gewonnenen Apoenzyms durch FAD-Spuren vorhanden ist.

Da das Apoenzym nach der Chromatographie sofort neutralisiert werden muß, rekombiniert restliches FAD zum aktiven Holoenzym. Dieses Problem ist auch daran zu erkennen, daß die besten bisher bekannten Spaltungsvorschriften nach der Chromatographie eine Inkubation mit Aktivkohle vorsehen, die restliches FAD binden soll. Die Verwendung von Aktivkohle erniedrigt die Restaktivität der Apo-GOD signifikant. Dies ist ein deutliches Zeichen für die mangelnde chromatographische Effizienz, auch wenn zusätzliche Probleme mit der Spaltung nicht ausgeschlossen werden können. Es konnte auch bestätigt werden, daß das Apoenzym unter den sauren Spaltungsbedingungen nur halbwegs stabil bleibt, wenn sowohl hohe Konzentrationen an Glycerin (Viskosität), als auch FAD anwesend sind. Wird das FAD abgetrennt, so wird das Apoenzym wesentlich instabiler und muß sofort neutralisiert werden. Dies ist auch der Grund, warum eine zweite derartige Chromatographie zur Verbesserung der Produktqualität ("Polishing") nicht anzuraten ist. In entsprechenden Versuchen wurde nur noch denaturiertes Protein gefunden. Andere Stabilisatoren konnten bisher nicht gefunden werden. Aus Literaturdaten (z.B. SWOBODA et al., 1969 [71]) ist bekannt, daß Apo-GOD eine viel offenere Konformation einnimmt als Holo-GOD. Dies läßt darauf schließen, daß bei der Entfernung des FADs eine partielle Entfaltung des Proteins stattfindet. Daher ist es nicht verwunderlich, daß Apo-GOD thermisch labiler als Holo-GOD ist und daher verstärkte Maßnahmen zur Stabilisierung erfordert. Auch die Gefrier Trocknung von Apo-GOD ist im Gegensatz zu GOD nicht trivial. Aus diesem Grund wurden zahlreiche Stabilisierungsmittel in diesem Zusammenhang untersucht. Zusammenfassend wird die Apo-GOD wie folgt gewonnen: Glucoseoxidase von *Aspergillus niger* wird 1 Stunde bei pH 1.5 (HCl/Glycin/Chaps/30% Glycerin) in der Kälte (4 °C) inkubiert. Diese Lösung wird auf einer analog äquilibrierten, gekühlten Sephadex-G-25-F-Säule von 25 cm Länge und 2 cm Ø aufgetrennt. Bei einer Flußrate von ca. 1 mL/min wird der farblose Apoenzym-Peak mittels Brechungsindexdetektor registriert und fraktioniert gesammelt. Die Fraktionen werden in Tris/Dextranpuffer mit Aktivkohle neutralisiert. Nach einer Stunde bei 4 °C wird die Aktivkohle abzentrifugiert und über 0.2 µm Polysulfonspritzenfilter abfiltriert. Das Filtrat kann einige Zeit im Kühlschrank aufbewahrt werden⁴.

³Die chemische Zusammensetzung des Gels scheint keine große Rolle zu spielen, so lange kein Zusammenbruch der räumlichen Struktur bei diesen extremen pH-Werten eintritt.

⁴Nach 4 Monaten bei 3 °C waren noch knapp 90% der Aktivität erhalten geblieben. Bei 23 °C sind noch über 20% der Aktivität übrig (Halbwertszeit ca. 2 Monate).

3.3.2 Antikörper

Generell sind an den Antikörper in einem ARIS keine anderen Ansprüche zu stellen als in anderen Immunoassays auch. So ist meist eine hohe Affinität zum Analyten erwünscht und die Matrixbestandteile sollen den Antikörper möglichst wenig beeinflussen. Letzteres ist besonders wichtig, da ein ARIS einen homogenen Immunoassay darstellt. Bei diesen ist definitionsgemäß eine Trennung von Probe und Reagenzien durch Waschschriffe nicht möglich. Untersucht man nun die einzelnen Reaktionsschritte eines ARIS, so wird klar, daß es sich hier um ein kinetisch gesteuertes System handelt, da letztendlich das FAD (bzw. hier das FAD-Derivat) quantitativ und wie oben dargestellt, quasi-irreversibel von der Apo-GOD gebunden wird. Dieser Zustand ist jedoch analytisch nicht brauchbar. Glücklicherweise wird dieser erst nach längerer Inkubationszeit der Reagenzien erreicht. Um jedoch diesen Nicht-Gleichgewichtszustand möglichst lange aufrechtzuerhalten⁵, muß der Antikörper-Analyt-Komplex eine möglichst geringe Dissoziationskonstante aufweisen. Da Gleichgewichtskonstante, Assoziationskonstante und Dissoziationskonstante in einem direkten Zusammenhang stehen, und die Assoziationskonstante in Wasser meist durch die Diffusionsgeschwindigkeit des Analyten bestimmt wird (und daher wenig variiert), bedeutet eine geringe Dissoziationsgeschwindigkeit auch zwangsläufig eine hohe Gleichgewichtskonstante (Affinitätskonstante, Bindungskonstante). Somit ist es erforderlich, hochaffine Antikörper einzusetzen. Da polyklonale Antikörper oft aus einer Mischung von hoch- und niedrigaffinen Antikörpern zusammengesetzt sind, und letztere durch ihre schnelle Dissoziation stören, ist auch die Anwendung monoklonaler Antikörper angezeigt. Bezüglich der Stabilität von Antikörpern gegenüber Matrixbestandteilen wurden zwar hohe Unterschiede empirisch ermittelt [59] und z.B. durch den Einfluß einer kommerziellen Huminsäure direkt vergleichbar gemacht, der Mechanismus dieser Unterschiede ist jedoch noch weitgehend spekulativ.

Nicht nur für homogene Immunoassays oder immunologische Teststreifen, sondern auch für die meisten Immunsensoren oder sogar für konventionelle Mikrotiterplattenassays wäre ein wissensbasiertes Stabilitätsdesign für Proteine äußerst hilfreich. Da die Antikörper beim ARIS nicht markiert werden müssen, ist deren Reinheit (in Bezug auf Begleitproteine von vernachlässigbarer Analytaffinität) nicht kritisch. Im Gegenteil, gerade der Zusatz größerer Mengen an Albumin oder ähnlichem hat günstige Auswirkungen auf die Stabilität der Antikörper, so lange ein mikrobieller Befall verhindert werden kann. Die Selektivität der Antikörper hat mit dem ARIS selbst nichts zu tun und wird weitgehend von den Affinitätskonstanten des Antikörpers zu den untersuchten Analyten bestimmt. Dieses Verhalten ist bis auf wenige Ausnahmen [18, 19, 20] vorwiegend von der Struktur des Antikörpers selbst abhängig und daher nur durch den Austausch des Antikörpers beeinflussbar. Da auch ein ARIS ein klassisch kompetitives System darstellt, sind die Kreuzreaktionen in hohem Maße vergleichbar mit anderen kompetitiven Immunoassays basierend auf dem gleichen Antikörper.

Wie schon in anderen Abschnitten diskutiert, kann nicht generell gesagt werden, ob nun eine hohe oder eine geringere Selektivität (Gruppenselektivität) wünschenswerter ist. Dies hängt ganz von der analytischen Fragestellung

⁵Die Annäherung an den Gleichgewichtszustand führt auch zu einem zunehmenden Verlust an Empfindlichkeit.

ab. Es kann jedoch eindeutig gesagt werden, daß prinzipiell jeder Immunoassay Kreuzreaktionen aufweist. Es kommt nur darauf an, ob diese Kreuzreaktionen relevant sind und wenn ja, ob sie sich störend oder sogar günstig (im Sinne einer Gruppenbestimmung) auswirken. Für den hier beschriebenen ARIS, der zur Detektion von TNT in Wasser entwickelt wurde, konnte auch einen bestehenden monoklonalen Antikörper der Fa. Strategic Diagnostics, Inc. (SDI) zurückgegriffen werden. Dieser Antikörper-Klon (*A/1.1.1*) war aus früheren Arbeiten als robust und ausreichend affin bekannt. Später wurde eine detaillierte Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers durchgeführt [74]. Um die nachträgliche Dissoziation des Konjugat-Antikörper-Komplexes zu minimieren, ist eine geringe Dissoziationsrate, d.h. in der Regel eine hohe Affinitätskonstante zum Hapten des Konjugats notwendig. Da das Hapten, das zu Herstellung des TNT-Antikörpers verwendet wurde, als suboptimal anzusehen ist, ist es denkbar, daß mit einer besseren Haptenstruktur noch deutlich affinere Antikörper gewonnen werden könnten.

3.3.3 Konjugat aus prosthetischer Gruppe und Hapten

Das charakteristische Reagenz eines ARIS bildet das Konjugat aus Hapten und prosthetischer Gruppe, im Falle der Glucose-Oxidase handelt es sich um ein FAD-Hapten-Konjugat. Betrachtet man die Struktur des FADs, so stellt sich zuerst die Frage, an welcher Position des Moleküls eine Derivatisierung sinnvoll und möglich erscheint. Dies hängt in erster Linie auch von der Orientierung des FADs im Holoenzym ab, denn es ist notwendig, daß die modifizierte Position des FADs an einer möglichst "offenen" Stelle im Protein liegt, da ansonsten die Rekombination stark behindert würde und die Enzymaktivität eines Apo-GOD/FAD-Hapten-Komplexes zu niedrig wäre. Eine systematische Untersuchung fehlt zu diese Frage leider, trotzdem sind von einigen Molekülen Rekombinationsdaten vorhanden, die Rückschlüsse auf günstige oder ungünstige Positionen zulassen. Einige grundlegende Überlegungen sind trotzdem hilfreich. So ist der größte Teil des 7,8-Dimethylisalloxazinrings (Flavinteil) in den Redoxprozeß des Enzyms eingebunden und scheidet daher als Derivatisierungsposition weitgehend aus. Da bekannt ist, daß die Pyrophosphatgruppierung und die Ribose des Adenosins kritisch an der Bindung des FADs am Apoenzym beteiligt sind, sind auch deren Modifizierung unerwünscht. Zusätzlich muß noch die räumliche Zugänglichkeit berücksichtigt werden. Diese Einschränkungen führten dazu, daß die N⁶-Position des Adenosins als besonders geeignet angesehen wird. Beim experimentellen Vergleich eines Adenosin-N⁶-modifizierten mit einem Adenosin-C⁸-modifizierten Derivat, zeigte sich das erstere als überlegen. Diese Ergebnisse führten letztlich wohl dazu, daß die ganz überwiegende Anzahl der publizierten Systeme auf der Basis eines N⁶-(6-Aminohexyl)-FADs aufgebaut wurden.

Die Spacerlänge ist des Konjugats ist bei einem ARIS relativ kritisch. Ist der Spacer zu kurz, so behindert das die Rekombination so stark, daß eine Reaktivierung des Apoenzyms nur unvollkommen oder gar nicht stattfindet. Ist der Spacer zu lang, so tritt keine Konkurrenz zwischen Apoenzym und Antikörper auf – dies führt dazu, daß keine Abhängigkeit des Signals von der Analytkonzentration registriert wird. Der 6-Aminohexansäure-Spacer, der von den meisten Gruppen verwendet wurde, scheint in der Nähe des Optimums zu liegen. Daher war geplant, das aus der Literatur bekannte Derivat zu synthetisieren [75]. Dies hat den Vorteil, daß die freie primäre Aminogruppe sehr leicht derivatisiert und

so zur Ankopplung des Haptens genutzt werden kann. Mit dem Schlüsseldivat 6-Aminohexansäure-FAD wäre die Variation des Haptens bzw. die Umstellung des ARIS auf einen anderen Analyten relativ leicht vonstatten gegangen. Leider stellten sich die bekannten Literatursynthesen als schlecht reproduzierbar und sehr ineffizient heraus. Auch Rückfragen bei den Autoren der Synthesevorschriften führten nicht zur Klärung des Sachverhalts. Möglicherweise nutzen die an der kommerziellen Nutzung des ARIS Beteiligten die mangelhafte Veröffentlichung des Syntheseverfahrens, um ihr "Intellectual property" zusätzlich zu ihren Patenten zu schützen⁶.

Es existieren verschiedene Strategien, um N⁶-substituierte FAD-Derivate zu erhalten. Die überwiegende Anzahl von Synthesen geht von Adenosin oder dessen Derivaten aus. Erst nach Einführung des gewünschten Substituenten und einer etwaigen Phosphorylierung wird eine Kopplung mit FMN durchgeführt. Leider ist die Aminogruppe des Adenosins nur sehr wenig nucleophil und läßt sich nur schwer derivatisieren. Zwei Synthesen gehen vom preisgünstig erhältlichen Inosin aus. TRAYER wandelte dieses in das 6-Chlorinosin um, koppelte dieses mit 1,6-Diaminohexan und derivatisierte die freie Aminogruppe mit einer Trifluoracetylenschutzgruppe. Anschließend wurde das Derivat an der primären Hydroxygruppe phosphoryliert. Das Tributylammoniumsalz dieser Verbindung wurde mit N,N'-Carbonylimidazol zum Imidazolid umgesetzt. Dieses aktivierte Phosphorderivat wurde mit dem Octylammoniumsalz des AMPs zum FAD-Derivat gekoppelt. Am Schluß wurde die Trifluoracetylenschutzgruppe abgespalten und das Produkt chromatographisch gereinigt. Kritisch bei diesen Reaktionen ist die Hydrolyseempfindlichkeit vieler Komponenten und zusätzlich deren Schwerlöslichkeit in trockenen Lösungsmitteln. Die Gesamtausbeute lag daher auch ziemlich niedrig ($\ll 10\%$). SALEH et al. beschrieben eine andere Möglichkeit Inosin umzusetzen [76], die in der Silylierung der Hydroxygruppen besteht. Mit 1,6-Diaminohexan kann dann eine nucleophile Substitution durchgeführt werden. Nach der methanolischen Abspaltung der Trimethylsilylgruppen wurde die primäre Aminogruppe mit Ethyltrifluoracetat geschützt. Um die Anwendung von Ammoniumsalzen zu vermeiden, wurde in diesem Fall das FMN in Dimethylformamid mit 18-Krone-6 gelöst. Nach der Kopplung über das Imidazolid wurde entschützt und mit HPLC gereinigt. Bei dieser Synthese lag die Gesamtausbeute bei ca. 3%, bezogen auf Inosin.

Wesentlich eleganter wäre es jedoch, das sehr preisgünstige FAD als Edukt zu verwenden, da die schwierigsten Kopplungsschritte entfallen würden. Wie schon erwähnt, ist jedoch die N⁶-Position unreaktiv und kann nur schwer selektiv angegriffen werden. ZAPPELLI et al. fanden jedoch eine Lösung des Problems [77]. So kann das Adeninmolekül der N¹-Position mit elektrophilen Reagenzien, wie Epoxiden reagieren. So erhält man durch Alkylierung des FAD mittels 3,4-Epoxybuttersäure das N¹-(2-Hydroxy-3-carboxypropyl)-FAD. Behandelt man dieses Derivat bei 80°C mit alkalischer Lösung (pH 10), so tritt eine sog. DIMROTH-Umlagerung zum gewünschten N⁶-(2-Hydroxy-3-carboxypropyl)-FAD ein. Ein Polyethylenimin-Konjugat dieses Derivats war in der Lage mit Apo-GOD oder Apo-Aminosäureoxidase zum aktiven Holoenzym zu rekombinieren. Von BÜCKMANN wurde eine weitere Synthese ausgehend von FAD entwickelt. Hier wird bei 30 °C und pH 3.5 FAD mit Ethylenimin umgesetzt. Auch hier führt der

⁶Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, daß fehlerhaft oder unvollständig offengelegte Synthesevorschriften zur Nichtigkeit eines Patents führen können.

Angriff des Elektrophils zu einer Alkylierung des N¹-Stickstoffs. Die DIMROTH-Umlagerung tritt bei 2-Aminoethylderivaten unter sehr milden Bedingungen ein. So genügt die Einstellung auf pH 6.5 bei einer Temperatur von 40 °C, um in ca. 7 Stunden eine weitgehende Umsetzung zum N⁶-(2-Aminoethyl)-FAD zu erreichen (siehe Abb. 3.2). Ein kleiner Anteil von 1,N⁶-(2-Aminoethyl)-FAD wurde als Nebenprodukt gefunden. Leider ist diese elegante Umlagerung auf 2-Aminoethyl-Derivate beschränkt. Sollen andere FAD-Derivate synthetisiert werden, so ist ein Weg über das 2-Aminoethyl-Derivat notwendig. Vorteilhaft wirkt sich jedoch die einfache und selektive Derivatisierbarkeit der primären Aminogruppe des 2-Aminoethylrests aus. So wurde von RILKIN et al. ein Ferrocen-gekoppeltes FAD synthetisiert, in dem eine Ferrocencarbonsäure mittels EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) im Eintopf an die genannte Aminofunktion geknüpft wurde. Durch Verlängerung des C₂-Spacers der nach BÜCKMANN synthetisierten Derivate können fast beliebige FAD-Konjugate ausgehend von einem synthetisch gut zugänglichen Zwischenprodukt erhalten werden.

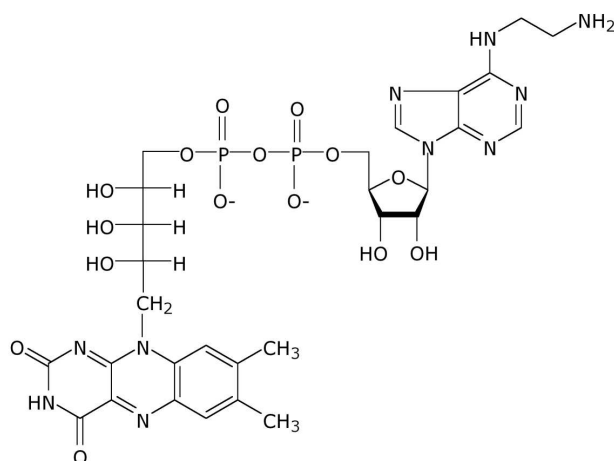


Abbildung 3.2: N⁶-(2-Aminoethyl)-FAD (Flavin-adenin-dinucleotid), zugänglich über eine Synthese nach BÜCKMANN

3.3.4 Synthese von FAD-TNT-Konjugaten

Die Möglichkeiten der FAD-Spacer-Kopplung wurden im vorigen Abschnitt besprochen. Mit einem konkreten Hapten, hier 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT), sind noch weitere strategische Überlegungen notwendig. Ideal wäre es, das Hapten im letzten Schritt einzuführen, um die gesamte Synthese weitgehend übertragbar zu gestalten. Das 6-Aminohexansäurederivat könnte als Zwischenprodukt erhalten werden und für die Assayentwicklung verschiedener Haptene eingesetzt werden. Betrachtet man jedoch die Notwendigkeit, die endständige Aminofunktion zu schützen und am Ende zu entschützen, so führt die frühzeitige Einführung des Haptens zu einer signifikanten Verkürzung und Vereinfachung der Synthese, vorausgesetzt, es treten keine hapteninduzierten Komplikationen ein.

Als eine erste Strategie sollte von N⁶-(Aminohexyl)adenosin-5'-phosphat-Natriumsalz (kommerziell von Sigma erhältlich) mit Trinitrobenzolsulfonsäu-

re (TNBS) umgesetzt werden, um erstens die Aminofunktion zu schützen und zweitens das Hapten einzuführen. Nach einer Phosphat-Aktivierung mit N,N'-Carbonylimidazol sollte eine Kopplung mit Flavinmononucleotid (FMN) durchgeführt werden. Problematisch stellte sich in der Praxis heraus, daß das N⁶-(Aminohexyl)adenosin-5'-phosphat-Natriumsalz nur in wäßrigen Medien ausreichend löslich ist, die Kopplung mit FMN jedoch wasserfreie Bedingungen erfordert. Auch die Verwendung von Benzo-15-krone-5, um das Natriumsalz kompatibel mit wasserfreien Lösungsmitteln zu machen, führte nicht zum Erfolg. Auch die aufwendigere Strategie, die Aminogruppe mit einer FMOC-Gruppe zu schützen, änderte am negativen Ergebnis nichts.

Aus diesem Grund wurde ein anderer Weg eingeschlagen, die Totalsynthese ausgehend von Inosin. Laut Literatur sollte die Umsetzung von Inosin, katalytischen Mengen p-Toluolsulfonsäure, Hexamethyldisilazan (Silylierungsmittel) und 1,6-Hexandiamin, anschließender Abspaltung der Silylschutzgruppen mit Methanol und Schutz der Aminofunktion mit Ethyltrifluoracetat zu einem Trifluoracetyl-geschützten Hexylamin-Derivat des Adenosins führen. Von dieser Verbindung konnte ungefähr 1 Gramm (Ausbeute < 20%) synthetisiert werden. Die Phosphorylierung führte jedoch zu so geringen Ausbeuten, daß die Synthese an dieser Stelle abgebrochen werden mußte. Ein Ausweg ergab sich durch die Verwendung eines FAD-C₂-Derivats, das von BÜCKMANN zur Verfügung gestellt werden konnte und im Gegensatz zu den oben genannten Verbindungen synthetisch gut zugänglich ist. Unklar war jedoch, ob sich die Änderung des Spacers auf die Funktionsfähigkeit des ARIS negativ auswirken würde. Die Kopplung der freien primären Aminogruppe des FAD-C₂-Derivats mit Trinitrophenyl- γ -aminobuttersäure-NHS-Ester führte zu einem Spacer mit 9 Atomen Länge und einer Amidgruppe (siehe Abb. 3.3), die in den bisher verwendeten Derivaten nicht enthalten war. Die Synthese konnte mit hoher Ausbeute durchgeführt werden, es ist ein praktisch quantitativer Umsatz des C₂-Derivats zu verzeichnen. UV-VIS- und ESI-MS-Daten bestätigten die Struktur des gewünschten Derivats. Eine Reinigung des Produkts kann mit präparativer Dünnschichtchromatographie (RP-18-Material, Acetonitril/Wasser 10:2 Vol.) erreicht werden. Besser scheint jedoch eine präparative HPLC-Methode geeignet zu sein, die ein chromatographisch einheitliches Produkt liefert.

3.3.5 Funktionsprüfung des FAD-TNT-Konjugats

Das synthetisierte FAD-TNT-Konjugat wurde mit drei Tests auf seine ordnungsgemäße Funktion überprüft. Zuerst wurde das Konjugat in einem direkten, kompetitiven Immunoassay gegen TNT auf seine Kreuzreaktion untersucht. Die Ergebnisse zeigen, ob und wie stark das Konjugat von dem betreffenden monoklonalen Antikörper gebunden wird. Geringe Kreuzreaktionen würden z.B. auf sterische Probleme hinweisen. Der verwendete Antikörper *A/1.1.1* zeigte jedoch eine molare Kreuzreaktion von ca. 200% relativ zu TNT. Dies weist auf zusätzliche, bindende Wechselwirkungen hin. Später stellte sich heraus, daß ein ähnliches Derivat zur Immunisierung (Herstellung des MAbs *A/1.1.1*) verwendet worden war. Auf jeden Fall ist die Situation insofern günstig, als daß der Antikörper das Konjugat stark bindet und daher eine Dissoziation des Komplexes nur langsam stattfindet. Eine weitere Funktionsprüfung ist die Rekombination des Konjugats mit Apo-Glucoseoxidase. Hier sollte festgestellt werden, ob eine ungestörte Bindung der prosthetischen Gruppe stattfinden kann. Dies wurde in

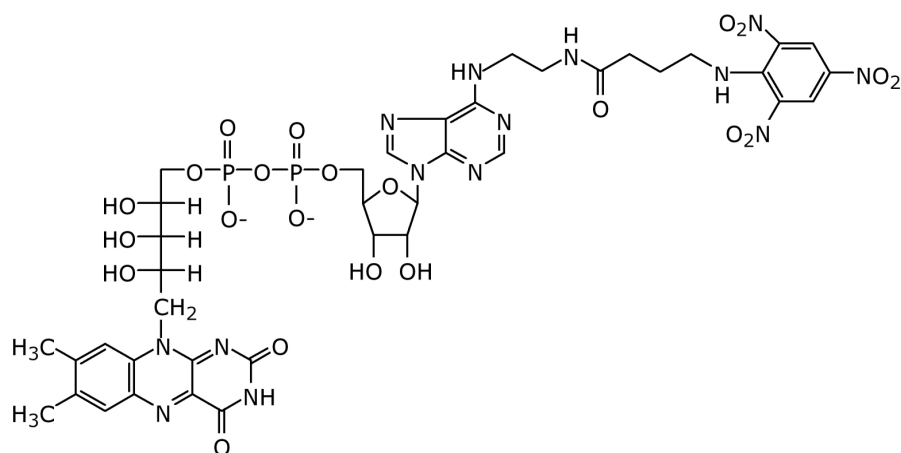


Abbildung 3.3: FAD-TNT-Konjugat, synthetisiert ausgehend von 2-Aminoethyl-FAD

Citratpuffer pH 5.5 (plus 30% Glycerin) getestet, da bei diesem pH die GOD ein Aktivitätsmaximum aufweist und andererseits Tetramethylbenzidin eine ausreichende Löslichkeit besitzt. Es wird eine typische Sättigungskurve erhalten, bei der ab einer bestimmten Konzentration des FADs oder FAD-Konjugats keine signifikante Steigerung des Signals eintritt. Die Rekombination ist auch zeitabhängig, was dazu führt, daß kürzere Rekombinationsdauern zu schwächeren Signalen führen. Im Vergleich zum FAD zeigte sich, daß das synthetisierte FAD-Konjugat eine etwa 10fach schwächere Bindung aufweist und folglich eine ca. 10fach höhere Konzentration zur Sättigung vonnöten ist. Letztlich wurde der Einfluß des Antikörpers auf die Rekombination des Konjugats mit Apo-GOD untersucht. Es wurde eine deutliche Inhibition gefunden, die abhängig von der Reinheit des Konjugats einen unterschiedlich hohen "Sockelwert" aufwies. Zudem wurde noch der direkte Einfluß von TNT auf die Rekombination von FAD-TNT mit GOD untersucht. Es konnte keinerlei Einfluß bis 10 ppm TNT gefunden werden.

3.3.6 Hintergrundfärbung durch Wasserstoffperoxid

Da das Signal des Rekombinationsassays trotz hoher Antikörperkonzentrationen nicht völlig inhibierbar war, wurde nach der Ursache gesucht. Es stellte sich nun heraus, daß das zur Stabilisierung eingesetzte Glycerin mit H_2O_2 kontaminiert war. Es wurden verschiedene Reinheitsgrade untersucht. Das Ergebnis zeigte keinen direkten Zusammenhang mit der deklarierten Reinheit, im Gegenteil, eine besonders hochwertige Sorte Fluka 99.5%, molec. biol., zeigte das höchste Signal. Vielleicht hängt dies mit zusätzlichen Behandlungsschritten zusammen, die möglicherweise zur Zerstörung von DNA/RNA angewendet werden und zur Radikal- und letztlich Wasserstoffperoxidbildung führen. Es mußten jedoch außer der Auswahl des geeignetsten Produkts keine weiteren Maßnahmen zur Reduktion des Peroxidgehaltes vorgenommen werden. Es wurde aber festgestellt, daß Reste von Maschinengeschirrspülmitteln zu unreproduzierbaren Per-

oxidkontaminationen führen können. Daher sind die für den ARIS verwendeten Geräte besonders sorgfältig nachzuspülen. Die trotz dieser Vorkehrungen vorhandene Hintergrundfärbung (bei einem von MORRIS publizierten Theophyllin-Assay [78, 79] betrug diese fast ca. 40%) ist vermutlich mechanistisch bedingt und wird insbesondere dadurch verursacht, daß auch bei fehlendem Analyten der Antikörper nicht zur 100%igen Komplexierung des FAD-TNT-Konjugats führt. Man muß auch berücksichtigen, daß die FAD-Apo-GOD-Bindung quasi-irreversibel mit extrem hoher Affinität stattfindet. Dies ist gleichbedeutend mit einer langsamen Extraktion des FAD-TNT-Konjugats aus den Antikörperbindungsstellen.

3.3.7 Optimierung des ARIS

Ein ARIS ist ein verhältnismäßig komplexer Assay mit mehreren Komponenten. Da die meisten kinetischen und thermodynamischen Daten der beteiligten Reagenzien unbekannt sind, ist nur eine empirische Optimierung möglich. Variiert man die FAD-TNT-Konjugat-Konzentration, so verschiebt sich der Offset der Kalibrierkurve. Es sollte die niedrigste Konjugat-Konzentration gewählt werden, die noch ein ausreichendes Signal ergibt. Die Erhöhung der Apo-GOD-Konzentration gibt ein höheres Signal und steilere Kalibrierkurven. Leider steigt auch das Hintergrundsignal an. Damit ist der Erhöhung der Apo-GOD-Konzentration eine Grenze gesetzt. Da dieser Hintergrund ungefähr proportional zur Apo-GOD-Konzentration ist, ist die Annahme gerechtfertigt, daß es sich um eine Kontamination der Apo-GOD mit FAD handeln könnte. Daraus kann man schlußfolgern, daß eine verbesserte Reinigung der Apo-GOD zu einer entsprechend verbesserten Performance des ARIS führen würde. Die Optimierung der Antikörperkonzentration ist besonders kritisch. Bei sehr niedrigen Antikörperkonzentrationen tritt keine ausreichende Inhibition des Signals ein. Bei zu hohen Antikörperkonzentrationen tritt ein Effekt auf, der bei allen kompetitiven Immunoassays wohlbekannt ist: Die Sensitivität nimmt stark ab. Daher muß das Optimum durch entsprechende Verdünnungsreihen experimentell bestimmt werden.

Es müssen jedoch nicht nur die Konzentrationen, sondern auch andere Parameter wie Inkubationszeiten, pH-Werte, Additivzugaben eingestellt werden. Die verlängerte Inkubation sowohl des Antikörpers, als auch des FAD-Konjugats führte zu keiner Verbesserung – im Gegenteil, kurze Inkubationszeiten zeigten sich als tendenziell günstiger. Dies wirkte sich positiv auf den Transfer des Systems auf ein Teststreifenformat aus. In einer optimierten Form des homogenen Assays wurde eine Nachweisgrenze von ca. 5 ppb TNT in Wasser erzielt. Betrachtet man die molaren Verhältnisse der Reagenzien, so wird deutlich, daß der Testmittelpunkt des Assays ungefähr dem Kehrwert der FAD-TNT-Konzentration entspricht. Dagegen liegen sowohl die Antikörperbindungsstellen (Faktor 12), als auch die Apo-GOD (Faktor 30) in deutlichem Überschuß vor. Da sowohl der Anteil der aktiven Antikörper, als auch der Apo-GOD nicht genau bekannt ist, kann keine Aussage über die effektiven Überschüsse gemacht werden. Dies wird besonders durch die Antikörperkonzentration deutlich. Da zu hohe Antikörperkonzentrationen die Konkurrenz behindern und daher starke Empfindlichkeitseinbußen zu erwarten sind, müssen zu hohe Antikörperkonzentrationen vermieden werden. Andererseits führen zu niedrige Antikörperkonzentrationen zu erhöhten Untergrundsignalen durch mangelhafte Inhibition der

Enzymrekombination.

3.3.8 Übertragung in ein Teststreifenformat

Ein entscheidender Vorteil von homogenen Immunoassays ist deren relativ einfache Übertragung in Teststreifen- oder andere Schnelltestformate. Dies ist darauf zurückzuführen, daß der Mechanismus z.B. des ARIS weder die Immobilisierung einer Komponente erfordert, noch Waschschriffe durchgeführt werden müssen. Ein sehr einfaches, aber effektives Schnelltestformat ist die trockene Bereitstellung aller Komponenten in einer Mikrotiterplatte [80]. Durch Hinzufügen der wäßrigen Probe wird die Reaktion gestartet und kann zu einem fast beliebigen Zeitpunkt abgelesen werden bzw. gestoppt werden. Alle anderen Handhabungsschritte entfallen. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, daß bestimmte Reagenzien (TNT-FAD, Apo-GOD, Antikörper) nicht vermischt werden dürfen und zumindest mikroskopisch getrennt vorliegen. Dies kann z.B. durch getrennte Gefriertrocknung und Mischen der Pulver erreicht werden, oder durch eine sequentielle Trocknung der Reagenzien z.B. in der Kavität. Schwierig ist in diesem Zusammenhang, daß die schon getrockneten Spezies sich durch das Hinzufügen weiterer Lösungen nicht wieder lösen dürfen. Dazu kann man z.B. Isolierschichten einbringen, oder inkompatible Lösungsmittel verwenden. So kann man das Hapten-FAD-Konjugat in organischen Lösungsmitteln lösen, die schon getrocknete Proteine nicht anlösen. Die mikroskopische Trennung einiger Komponenten ist notwendig, um eine vorzeitige Reaktion zu vermeiden. So bildet Apo-GOD mit dem TNT-FAD-Konjugat einen quasi-irreversiblen Komplex. Dies würde jede Kompetition mit einem Antikörper ausschließen. Aus diesen Randbedingungen kann man erkennen, daß die genannten Assays in einem "kinetischen" Regime durchgeführt werden (müssen).

3.3.9 Stabilisierung der Komponenten

Besonderes Augenmerk erfordern alle Reagenzien, die aus Proteinen bestehen – so insbesondere die Antikörper, als auch die Apo-GOD. Der Verlust an Aktivität eines Proteins kann durch viele unterschiedliche Mechanismen eintreten. Daher sind auch keine allgemein anwendbaren Rezepte zur Proteinstabilisierung verfügbar. Jeder einzelne Desaktivierungsmechanismus erfordert gezielte Gegenstrategien, auch wenn die Auswahl momentan noch sehr begrenzt ist. Unterscheiden muß man eine Denaturierung, die in erster Linie auf eine Entfaltung des Proteins zurückzuführen ist. Besitzt das native Protein eine niedrigere Energie, als das entfaltete, so kann unter Umständen eine Rückfaltung in den nativen Zustand eintreten. Dies tritt bei kleinen Proteinen häufiger und mit höherer Effizienz auf als bei großen. Anders ist die Situation jedoch, wenn die Entfaltung entweder energetisch günstig ist, oder die Primärstruktur des Proteins modifiziert wird [81]. Zu letzterem zählt z.B. die Oxidation von Aminosäuren (Methionin, Cystein, Tyrosin, Tryptophan etc.), Deamidierung von Glutamin oder Asparagin oder der Verlust von Lysinen durch MAILLARD-Reaktionen. Diese meist irreversiblen Veränderungen verhindern oft auch eine Renaturierung der Tertiärstruktur.

Konzepte zur Proteinstabilisierung [82] müssen idealerweise alle denaturierenden Vorgänge unterbinden. In vielen Stabilisierungsrezepturen spielen Polymere, wie Polyethylenglycol (PEG) bzw. Methoxy-Polyethylenglycol (M-PEG)

eine wichtige Rolle. Es wird vermutet, daß PEG Micellen um die Proteine bildet, die diese z.B. beim Einfrieren und Auftauen vor Denaturierung schützen. Da PEG nur wenige oder gar keine OH-Gruppen besitzt, ist deren Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken auf die Donorwirkung beschränkt. Dagegen können Polymere wie Polyvinylalkohol oder Zucker, wie Lactose, Glucose, Saccharose oder besonders Trehalose [83, 84, 85] oder Polyole wie Glycerin, sowohl als Donoren, als auch als Akzeptoren Wasserstoffbrücken ausbilden, was sich schon an der hohen Viskosität ihrer Lösungen andeutet. Man geht davon aus, daß bei der Denaturierung durch Trockenprozesse z.B. Lyophilisierung (Gefrier-trocknung) die o.g. Verbindungen das Wasser in seiner strukturbildenden Funktion zumindest partiell ersetzen können. Da die Denaturierung eines Proteins ein zeitabhängiger Prozeß ist, kann auch die Verlangsamung der Denaturierungskinetik hilfreich sein. Dies wird sehr häufig eingesetzt, in dem man Proteine nicht bei Zimmertemperatur, sondern bei 4 °C oder noch tieferen Temperaturen aufbewahrt. Es hat sich bei unseren Experimenten auch gezeigt, daß ein wichtiger Stabilisierungseffekt durch die einfache Erhöhung der Viskosität eintritt. Es war von sekundärer Bedeutung, mit welchem Additiv eine bestimmte Viskositätserhöhung erreicht wurde. Auch die Arbeiten anderer Gruppen deuten in diese Richtung. So wurde gefunden, daß die Stabilisierung nicht von einer Glasbildung abhängt [86], sondern nur eine Kristallisation verhindert werden muß. Man kann annehmen, daß in viskosen Lösungen die Entfaltung von Proteinen stark verlangsamt wird und daher viele Denaturierungsprozesse unterdrückt werden. Interessant sind die Indizien, daß dieser sehr effektive Prozeß unspezifisch zu sein scheint. Dies macht ihn zu einer erstaunlich breit anwendbaren Stabilisierungsmethode. Vermutlich ist die oft angewendete Methode der Aufbewahrung von Proteinen in 66%igem Glycerin bei -20 °C aus ähnlichen Gründen erfolgreich.

Die Immobilisierung von Proteinen stellt einen anderen Weg der Stabilisierung dar, wobei man *Einschluß* und *Fixierung* unterscheidet. Der Einschluß von Proteinen kann z.B. mittels einer Calcium-Alginat-Matrix (auch für lebende Zellen) oder einer Sol-Gel-Methode erzielt werden. Bei letzteren wird z.B. Tetraethoxysilan in einem verdünnter Salzsäure gelöst und nach einer hydrolytischen Inkubation mit dem einzuschließenden Protein (in Puffer) vermischt. Die zunehmende Vernetzung zu einem Silikatgerüst umschließt die Proteine so effektiv, daß nach einer kurzen Alterungsphase kein Leaching (Auslaugen) mehr beobachtet wird. Sowohl die thermische als auch chemische Stabilität der Proteine wird durch den Einschluß erheblich verbessert. Sowohl der direkte Angriff durch Mikroorganismen, als auch der indirekt proteolytische Angriff wird durch die geringe Porengröße effektiv verhindert. Es ist jedoch einleuchtend, daß z.B. Enzyme oder Antikörper, die in Wechselwirkung mit großen Molekülen wie anderen Proteinen oder DNA treten sollen, nur mit Einschränkungen für eine Sol-Gel-Methode geeignet sind – im Gegensatz z.B. zur pH- [87] oder Glucose-Messung [88] mittels optischen Sensoren.

Oberflächenimmobilisierungen sind sehr weit verbreitet, da die entsprechenden Trägermaterialien, oft schon aktiviert, kommerziell erhältlich sind. Als Träger sind *Sephadex* (Dextran), *Toyopearl* (synthetisches Copolymer), *Trisoppearl* (poröses Glas) usw. gebräuchlich. Zur Kopplung sind zahllose Methoden beschrieben worden (z.B. siehe [89]). So sind u.a. Bromcyan-, Epoxid-, Tresyl-, N-Hydroxysuccinimid-, Cyanurchlorid-, Glutaraldehyd-, Isocyanat-, Isothiocyanat-, Azlacton-, Acylazid-, Sulfonylchlorid-, Disuccinimidylcarbonat-, Imidoester- und Carbodiimid-Aktivierungen für die Kopplung mit Aminogruppen gebräuchlich

[90]. Für die Reaktion mit Thiolen werden Haloacetyl-, Haloalkyl-, Maleimid-, Aziridin-, Acryloyl- und Disulfid-Aktivierungen verwendet.

Weniger selektiv in ihrer Reaktivität sind in der Regel photochemische Systeme, die vorwiegend auf Arylaziden, Benzophenonen oder Diazirinen basieren. Stehen Aldehydgruppen z.B. durch Oxidation (Periodat) von Kohlenhydraten zur Verfügung, so wird auch nicht selten eine reduktive Aminierung verwendet. Diese Kopplung kann entweder von einer intermediären Schiff'schen Base oder einem Hydrazone ausgehen, die mittels Natriumcyanborhydrid (oder Natriumborhydrid) reduziert werden und die Bindung damit stabilisiert wird. Varianten der o.g. Aktivierungen sind Reaktionen mit sog. homobisfunktionellen oder heterobisfunktionellen Derivaten, die in der Regel verwendet werden, um einen Spacer (Abstandshalter) definierter Länge einzuführen. Hiermit kann man sterische Probleme z.B. an einer Oberfläche umgehen. Besonders geeignet zur Stabilisierung von Proteinen auf Trägermaterialien gilt die Verwendung von Spacer-Derivaten unterschiedlicher Länge. Hiermit können reaktive Gruppen (z.B. Lysinseitenketten) mit der Oberfläche verknüpft werden, auch wenn sie unterschiedliche Abstände zur Oberfläche aufweisen. Als ideal wird eine Situation angesehen, bei der die Entfaltung des Proteins durch zahlreiche räumliche Verknüpfungspunkte verhindert wird, die Tertiärstruktur des Proteins durch diese Modifizierung aber möglichst wenig verändert wird und noch genügend Flexibilität vorhanden ist, daß das Protein seine Funktion ausführen kann. Hierzu gehört auch der möglichst ungestörte Zugang zum aktiven Zentrum. Es ist einleuchtend, daß viele dieser Bedingungen schwierig gleichzeitig erfüllt werden können und daher nur eine mehr oder weniger gute Annäherung an das Ideal erreicht werden kann. Besonders schwierig gilt die orientierte Immobilisierung von Proteinen, die oft mit Hilfe von biochemischen Hilfssystemen durchgeführt wird (Protein A/G/L mit Immunglobulinen, Biotin/Streptavidin, His-Tags), jedoch auch chemische Systeme sind in Gebrauch (Antikörperfragmente mit reduzierten Disulfid-Brücken, oxidierte Kohlenhydrate eines Glycoproteins).

Einen völlig anderen Stabilisierungsansatz stellen rekombinante Methoden dar. Man versucht die als Reagenzien zu verwendenden Proteine so zu "mutieren", daß stabilere Varianten erhalten werden. Man muß hier *Random-Mutagenesis* und *Site-directed-Mutagenesis* unterscheiden. Letztere benötigt jedoch ausreichende Informationen über die Proteinstruktur – mindestens die Aminosäuresequenz. Wesentlich bessere Ansatzpunkte können aus einer Kristallstruktur gewonnen werden, mit der kritische Aminosäuren leichter identifiziert und anschließend ausgetauscht werden können. Die auf Molecular Modeling basierende Optimierung von Proteinen ist jedoch schwieriger als dies allgemein angenommen wird. Oft sind zufallsbasierte Ansätze schneller und erfolgreicher. *Site-directed-Mutagenesis* wurde mit erheblichem Aufwand, aber auch überzeugendem Erfolg bei der Optimierung von Waschmittelproteasen [91, 92] eingesetzt. So wurde die Stabilität gegenüber Alkalien und Oxidationsmitteln stark verbessert. Um Lipasen zu erhalten, die auch bei niedrigen Waschttemperaturen aktiv genug sind, werden auch evolutionsbiologische Ansätze versucht, so die Untersuchung von Lipasen von Bakterien, die in Knochen unterseeischer Wal-Kadaver leben und bei ca. 4 °C Walfett metabolisieren [93]⁷. Man geht bei diesem Weg davon aus, daß über Jahrmillionen in entsprechenden ökologischen Nischen von angepassten Organismen schon hochoptimierte Lösungen gefunden wurden, die

⁷Diversa Corp., San Diego, USA

technisch einsetzbar sind. Systematisch wird dieser Ansatz bei der Suche nach hitzestabilen Enzymen eingesetzt: Eine besonders bekannte Quelle thermophiler Organismen, die zahlreiche hitzestabile Enzyme besitzen, sind heiße Quellen im Yellowstone-Park in Wyoming. Schlagzeilen machte der Streit um die Frage, wem entsprechende Lizenzgebühren zugute kommen sollen. Anfänglich ging die Verwaltung des Yellowstone-Parks bei entsprechenden Patenten (*Biodiversity*) leer aus.

Eine weitere rekombinante Methode stellen sog. Fusionsproteine dar. Die "Verschmelzung" zweier Proteine zu einem Fusionsprotein kann nicht nur die Ausbeute an richtig gefaltetem, aktivem Protein, den Transport in das richtige Kompartiment, die Erleichterung der Reinigung und das Hinzufügen sonstiger Funktionen bewirken, auch die Stabilität kann so optimiert werden. Radikale Ansätze zur Stabilisierung von Proteinen gehen vom Ersatz des kompletten Proteins aus. So werden seit Jahren Versuche zur Herstellung vollsynthetischer Enzyme [94] unternommen, die jedoch noch weitgehend in den Kinderschuhen stecken. Hier entwickelt sich auch eine Schnittstelle zur klassischen Katalyseforschung, die sich bisher vorwiegend im anorganischen Bereich bewegt hat. Auch die Molecular Imprints, die schon im Zusammenhang mit synthetischen Antikörpern erwähnt wurden, können zur Herstellung stabiler, synthetischer Enzyme verwendet werden [95]. Auch dieser Ansatz ist noch in einem sehr frühen Stadium. Der Ersatz des Amid-Grundgerüsts in Peptiden durch andere Gerüste (Sulfonamide, Harnstoffe, N-substituiertes Glycin u.a.) ist Thema intensiver Forschung [96]. Eine Totalsynthese entsprechender Pseudoproteine ist jedoch noch weitgehend Utopie.

Zur Stabilisierung der hier vorgestellten immunologischen Teststreifen wurde eine empirisch gefundene Mischung verwendet, die aus 51 g Trehalose, 10 g Polyvinylalkohol (MW 49000) und 0.5 g Rinderserumalbumin (BSA) in 1 Liter Citrat/Phosphat-Puffer pH 5.6 bestand. In Abb. 3.4 sind die zeitlichen Aktivitätsverläufe für verschiedene Lagerungsbedingungen (Zimmertemperatur oder Kühlschrank) gezeigt.

Es kann daraus geschlossen werden, daß die Stabilisierung für eine längerfristige Lagerung im Kühlschrank schon sehr gut ist, bei Zimmertemperatur die Aktivität aber schon nach wenigen Tagen unakzeptable Werte erreicht. Die Stabilisierung bei Zimmertemperatur müßte also ggf. noch mit weiteren Maßnahmen verbessert werden. Auch bei einem gut optimierten ARIS tritt noch eine geringe Untergrundfärbung auf, die sich zwar vom Gesamtsignal subtrahieren läßt, aber bei einer rein visuellen Auswertung irritieren kann. Daher wurden Anstrengungen unternommen, diesen Blank auf chemischem Weg zu entfernen. Es wurde gefunden, daß zu diesem Zweck Ascorbinsäure geeignet ist. Vermutlich tritt die Ascorbinsäure mit dem Tetramethylbenzidin in Konkurrenz und wird von Peroxidase bevorzugt oxidiert. Erst wenn die Ascorbinsäure quantitativ verbraucht ist, tritt eine Blaufärbung auf. Die Ascorbinsäure führt also zu einer chemischen Subtraktion des Hintergrunds. Zu viel Ascorbinsäure reduziert jedoch auch das erwünschte Signal, so daß der Ascorbinsäurezusatz gut optimiert werden muß.

3.3.10 Präzipitationsmittel

Die Verwendung von homogenen Immunoassays für das Design von Teststreifen hat nicht nur Vorteile. Sobald die Reagenzien in der Probenflüssigkeit gelöst

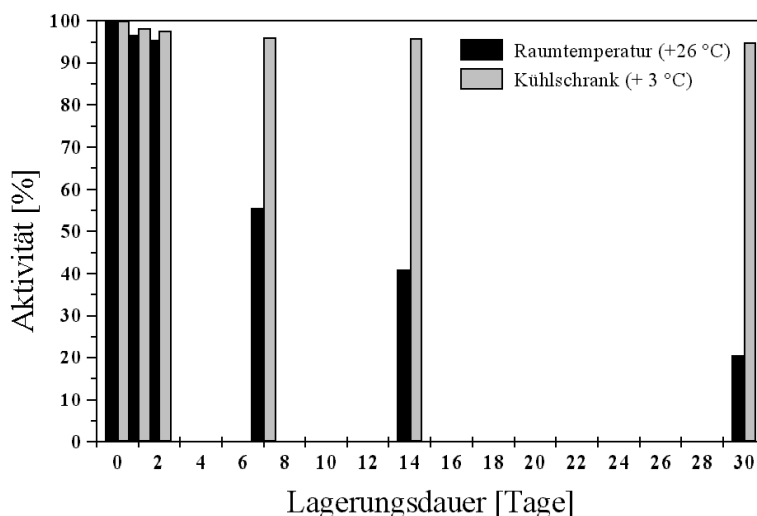


Abbildung 3.4: Stabilitätsuntersuchungen von ARIS-Teststreifen (aus [63])

sind, drohen sie unkontrolliert ausgewaschen zu werden. Dies kann zum einen durch eine geeignete Porenstruktur (Verlangsamung der Konvektion und Diffusion) erreicht werden. Kleine Reagenzmoleküle können jedoch durch ihre relativ schnelle Diffusion ggf. in die umgebende Lösung entweichen. Gerade bei der akkumulierenden Substratreaktion wirkt sich das negativ aus. Eine Möglichkeit dieses Problem zu lösen, ist die Verwendung eines Präzipitationsmittels. Hiermit wird erreicht, daß der gebildete Farbstoff an der Festphase abgeschieden wird und damit nicht mehr nennenswert diffundieren kann. Für Tetramethylbenzidin bzw. seine Oxidationsprodukte haben sich anionische Derivate Dioctylsulfosuccinat oder Dextransulfat als geeignet erwiesen. Die Verwendung von direkt präzipitierenden Substraten, wie Diaminobenzidin oder andere oxidierbare Substanzen ist weniger günstig, da Diaminobenzidin als starkes Kanzerogen eingestuft wird, andere Derivate dagegen von Peroxidase zu langsam umgesetzt werden und daher zu geringen Sensitivitäten führen. Tests haben ergeben, daß mit Dioctylsulfosuccinat ein empfindlicherer Immunoassay möglich ist, als mit Dextransulfat. Vielleicht wirkt sich die hohe Viskosität des Dextransulfats hier negativ aus. Auch Verunreinigungen in den Additiven kommen als Störfaktoren in Frage. Auch hier zeigt sich, daß sich die weitere Reinigung von Reagenzien günstig auswirken kann.

3.3.11 Kalibrierung

In den meisten Fällen wird man bei Schnelltests auf eine explizite Kalibrierung verzichten wollen. Die Kalibrierkurve bzw. eine visuell ablesbare Farbkarte müßte in diesen Fällen vom Hersteller mitgeliefert werden. Hier entstehen zwei Hauptprobleme. Erstens muß eine reproduzierbare Herstellung des Schnelltests gewährleistet sein. Dies hängt vorwiegend von der Herstellungstechnologie und deren Optimierung ab. Aufgrund der Vielzahl der Möglichkeiten kann hier keine allgemeine Aussage über die maximal erreichbare Reproduzierbarkeit ge-

macht werden. Zweitens muß gewährleistet werden, daß die “Werkskalibrierung“ auch bei gealterten Teststreifen noch anwendbar ist. Hierzu sind ausgedehnte Lagerungs- und Stabilitätstests erforderlich, um eine “Mindesthaltbarkeit“ garantieren zu können. Da eine unsachgemäße Lagerung nie ganz ausgeschlossen werden kann, müssen spezielle Maßnahmen ergriffen werden, die solche Fälle erfassen können. So könnten Farbzonen zur Detektion einer zu starken Erwärmung des Tests integriert werden und durch Positiv- und Negativkontrollen die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Tests vom Anwender verifiziert werden.

3.3.12 Qualitätskontrolle

Im Gegensatz zu konventionellen chemischen Reaktionen, bei denen handelsübliche Reinheiten meist ausreichen, muß bei entsprechend empfindlichen analytischen Tests damit gerechnet werden, daß auch scheinbar geringe Verunreinigungen signifikante Effekte ausüben können. Dies ist nicht verwunderlich, wenn man einmal die entsprechenden molaren Verhältnisse von Reagenzien und ggf. vorhandenen Verunreinigungen betrachtet. Daraus ergibt sich auch, daß Matrixeffekte bei komplexen Proben grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden können. Um verlässliche Analysen bei Schnelltests sicherzustellen, ist der Einbau von geeigneten Positiv- und Negativ-Kontrollen auch auf Teststreifen sehr zu empfehlen.

3.3.13 ARIS-Teststreifen für neue Analyten

Angesichts des beträchtlichen Aufwands zur Entwicklung und Optimierung des hier gezeigten ARIS-Teststreifens zur Detektion von Trinitrotoluol kann man sich die Frage stellen, wie schwierig es sein würde, das System auf einen oder mehrere andere Analyten umzustellen. Günstig wirkt sich hier aus, daß sich einige Reagenzien, wie die Apo-Glucoseoxidase, die Peroxidase, das Tetramethylbenzidin, die Stabilisatoren u.a. nicht ändern und daher sehr wahrscheinlich ohne weitere Optimierung übernommen werden können. Definitiv ausgetauscht werden muß der Antikörper und das FAD-Hapten-Konjugat. Geht man davon aus, daß der Antikörper aus einem anderen Testformat schon zur Verfügung steht, so kann dieser auch ohne größere Anpassungen eingesetzt werden. Es muß jedoch eine ausreichende Affinität des Antikörpers zum Analyten und zum FAD-Hapten-Konjugat vorausgesetzt werden. Letztlich bleibt die Synthese des FAD-Hapten-Konjugats unumgänglich. Für das FAD-TNT-Derivat war ein erheblicher Aufwand erforderlich, der die Entwicklung des TNT-Meßstreifens erheblich verzögert hat. Nach der Wahl einer neuartigen Synthesestrategie ist dieses Problem jedoch weitgehend gelöst. So sind durch Arbeiten von der Gruppe um BÜCKMANN [97, 98, 99, 100, 101] die Schlüsselverbindung 2-Aminoethyl-FAD und ähnliche Derivate leicht zugänglich geworden. Durch einfache Amid-Kopplung an die freie primäre Aminogruppe können ohne großen Aufwand FAD-Hapten-Konjugate verschiedenster Struktur mit hoher Ausbeute hergestellt werden. Die Reinigung kann über präparative HPLC in einer Stufe durchgeführt werden.

Kapitel 4

Detektion von gebundenen Rückständen

4.1 Definitionen

Obwohl eine ganze Reihe an Definitionen zur Verfügung stehen, kann keine bisher eine befriedigende Beschreibung von sog. gebundenen Rückständen (GR) liefern. Dieser Ausdruck wird weitgehend synonym zu nicht-extrahierbaren Rückständen gebraucht. Ursprünglich wurden diese Begriffe im Bereich der Pestizidanalytik geprägt und später auch auf andere Stoffklassen erweitert. Dies spiegelt sich aber in den meisten Definitionen nicht wider. Auch werden meist rein empirische Abgrenzungskriterien genannt, was z.B. dazu führt, daß die Menge eines gebundenen Rückstands stark von den Untersuchungsbedingungen abhängt und auch in einem stofflich geschlossenen System keine Konstante darstellt. Diese und andere Schwächen der existierenden Definitionen erfordern es, diesem Kapitel eine Definition voranzustellen, die versucht, den neuen Anforderungen gerecht zu werden. Anfangs wurden gebundene Rückstände nur in der Matrix Boden gesehen. Dies ist aber eine willkürliche Einschränkung. Schon bald wurden GR auch in Lebensmitteln, Pflanzen allgemein, oder anderen komplexen Matrices untersucht. Hier soll ein Definitionsversuch unternommen werden, der auf den Bindungsmechanismen der GR beruht. Diese Definition geht davon aus, daß es keine einheitlichen GR gibt, sondern daß der Begriff gebundene Rückstände ein Oberbegriff für verschiedene Spezies bildet (siehe Abb. 4.1), die jedoch meist getrennt behandelt werden müssen.

Als GR des Typ 1 sollen adsorbierte gebundene Rückstände gelten. Sie sind dadurch charakterisiert, daß sie in einem Bindungsgleichgewicht mit der Oberfläche der Matrixmoleküle stehen und daher bei geeigneten Extraktionsbedingungen (optimale Lösungsmittel, genügende Zeitdauer, thermische Unterstützung, Ungleichgewicht, etc.) quantitativ in Lösung gebracht werden können. GR des Typs 1 sind daher nur unter bestimmten Randbedingungen als immobilisiert anzusehen, aber ansonsten vollständig extrahierbar. Wäre der Analyt ein pharmazeutischer Stoff, so könnte man von einer Retard-Form oder einer Formulierung mit verzögerter Wirkstofffreisetzung sprechen.

Als GR des Typ 2 sollen eingeschlossene Rückstände gelten. Sie sind dadurch charakterisiert, daß durch eine sterische Blockade in einem Matrixnetz-

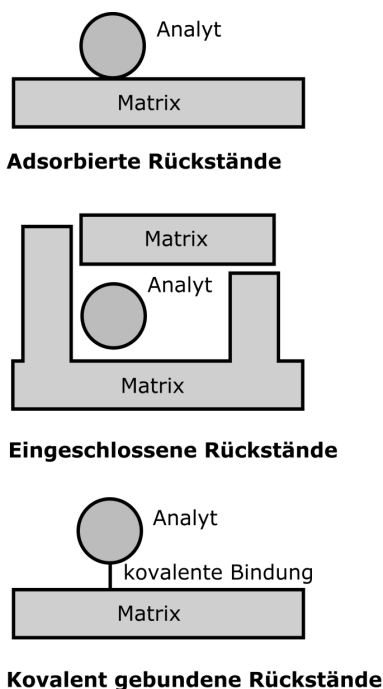


Abbildung 4.1: Die drei wichtigsten Typen von gebundenen Rückständen (GR). Typ 1: Adsorbierte GR, Typ 2: Eingeschlossene GR, Typ 3: Kovalente GR

werk die Analytmoleküle nicht oder nur schwer entweichen können. Als Grenzfall kann man diese Rückstände als nahezu irreversibel eingeschlossen ansehen, sofern die Integrität der Matrix selbst nicht angegriffen wird. Bricht man jedoch die Matrix, z.B. durch Quellung, chemische Derivatisierung oder auch thermisch auf, so können die Analytmoleküle quantitativ entweichen bzw. extrahiert werden. GR des Typ 2 können als ein konserviertes Reservoir des Analyten angesehen werden, die erst auf ein äußeres Signal hin freigesetzt werden. Bleibt dieses Signal aus, so wird der Analyt für lange Zeit weitgehend unverändert zurückgehalten. Als Typ 2 sollen auch Rückstände angesehen werden, die sterisch diffusionslimitiert sind. So können Typ-2-GR zwar langsam, aber letztlich quantitativ extrahiert werden, wenn auch der Grenzfall der idealen sterischen Blockade zu einer unendlich langen Extraktionszeit führen würde.

Als GR des Typ 3 sollen kovalent gebundene Rückstände gelten. Sie unterscheiden sich vom Typ 1 und 2 in erster Linie durch ihre kovalente Bindung zum Matrixgerüst. Dies führt auch dazu, daß GR des Typ 3 in der Regel nicht mehr aus dem Analyten selbst, sondern molekular verändert in Form eines Derivats vorliegen. Häufig ist auch die Regeneration des Analyten aus dem GR des Typs 3 aus chemischen Gründen ausgeschlossen. Bei einer etwaigen Freisetzung könnte nur ein chemisch veränderter Analyt freigesetzt werden. GR des Typs 3 werden häufig als irreversibel gebunden angesehen, was aber nicht zwangsläufig so sein muß, denkt man nur an die leicht hydrolysierbaren Thio- oder Phenylester. Besitzen GR des Typs 3 stabile kovalente Bindungen, so ist deren Abspaltung von der Matrix schwierig. In Realproben zeigen derartige Rückstände sehr lange

Halbwertszeiten. Interessanterweise ist es jedoch oft möglich, die GR des Typs 3 zusammen mit ihrer Matrix in Lösung zu bringen, ohne jedoch die kovalente Bindung zur Matrix zu spalten.

Es sind auch Mischformen denkbar, so kann z.B. ein Typ-1-GR gleichzeitig sterisch eingeschlossen sein (Typ 2). Welche Stoffsysteme sind nun als GR anzusehen? Offensichtlich zu eng gefaßt ist eine Beschränkung auf Pestizide, die eine eher funktionelle als eine chemisch klar abgegrenzte Gruppe ist. Nimmt man noch andere Schadstoffe, wie Sprengstoffrückstände (Nitroaromaten), Transformatoröle (Polychlorierte Biphenyle), Verbrennungsrückstände (Polycyclische Aromaten, Polychlorierte Dibenzodioxine und Dibenzofurane) usw. auf, stellt sich die Frage, ob natürliche Giftstoffe ausgeschlossen sein sollen. Da z.B. schon bei der natürlichen Entstehung von PAHs Abgrenzungsprobleme auftauchen, ist eine Einbeziehung auch nicht-anthropogener Stoffe notwendig. Auch Metaboliten von Stoffen können Ausgangspunkt von GR werden, so lange diese Metaboliten noch eine funktionelle Relevanz aufweisen. Sogar anorganische Spezies scheinen sich zwanglos in diese Reihe einzugliedern. Damit ist eine einfache Abgrenzung möglich:

Jede Substanz, die einen unerwünschten Rückstand darstellen kann, kann auch Gegenstand eines gebundenen Rückstands (GR) sein.

Welche Matrix soll nun berücksichtigt werden? Ursprünglich nur auf Boden bezogen, muß auch diese Definition inzwischen stark erweitert werden. So können in Pflanzen, Tieren, entsprechenden Lebensmitteln bzw. Produkten, sogar im Wasser oder in der Luft¹ gebundene Rückstände vorhanden sein. Sogar Festkörper aller Art und deren Oberflächen könnten als Matrix von GR dienen. Auch andere natürliche und synthetische Polymere (DNA, Proteine, Cellulose, Lignin, Melaminharz) könnten eine geeignete Matrix bilden. Charakteristisch scheint eine feste Phase oder ein polymeres Gerüst zu sein, wobei diese in einem Fluid suspendiert sein können². Die Bindung zwischen Substanz und Matrix soll in einer statistischen Form gebildet werden, die zu einer Vielzahl strukturell heterogenen Spezies in unterschiedlichen molekularen Umgebungen führt. Zur Abgrenzung von anderen Phänomenen sollen z.B. kovalente Konjugate, die als Sekundärmetaboliten (z.B. Glutathionkonjugate) bezeichnet werden, ausdrücklich nicht als gebundener Rückstand angesehen werden, da es sich hier um einzelne, chemisch definierte Spezies handelt. Jedoch würde man Protein-, DNA-Konjugate von reaktiven Spezies als GR diskutieren können.

Zur Abschätzung von GR werden häufig ¹⁴C-markierte Derivate eingesetzt, die z.B. auf einen Boden appliziert werden. Die nach einer "erschöpfenden" Extraktion verbleibende Radioaktivität wird oft als eine Summe aller GR angesehen. Dieser als "Gebundene Radioaktivität" bezeichnete Wert liegt aber über der Summe aller aus der obigen Definition gewonnenen Spezies und ist daher zwar als *Worst-case*-Szenario brauchbar, überschätzt aber die Menge an GR systematisch. Dies liegt u.a. an der sog. "Reassimilation", am Wiederaufbau von polymerem Material aus kleinen Molekülen, wie Acetat, Citrat, Amino-

¹In den beiden letzteren Fällen jedoch nur in Verbindung mit polymerer bzw. partikulärer Materie.

²Bei vielen Polymeren würde man auch *gelöst* sagen. Die Definition schließt jedoch gelöste Festkörper nicht ein, wenn der Festkörper in der Lösung in einfache Grundbausteine zerfallen ist, wie z.B. nach der Lösung eines Salzkristalls in Wasser.

säuren oder sogar Kohlendioxid. Stammen nun diese Abbauprodukte aus der ^{14}C -markierten Verbindung, so gelangen die markierten Atome wieder in den Kreislauf und werden letztlich als GR gewertet, auch wenn die molekulare Struktur des Schadstoffs schon vollständig zerstört ist. Reassimilierter Kohlenstoff ist daher eindeutig nicht als GR anzusehen, da er nur ein Artefakt der ^{14}C -Methode darstellt. In einigen Definitionen tauchen auch Begriffe, wie *“Normale landwirtschaftliche Nutzung“* bzw. *“Good agricultural practice“* oder ähnliches auf. Auch wenn das Argument der Pflanzenschutzindustrie einleuchtet, daß es einen Einfluß hat, in welcher Konzentration eine Substanz ausgebracht wurde, so gerät man durch Einbeziehung von juristisch motivierten Parametern leicht in logische Widersprüche. So ist bei diesen Definitionen völlig unklar geblieben, wie man dann Spezies nennen sollte, die z.B. bei illegaler oder rechtlich unklarer Ausbringung einer Substanz entstanden sind.

Typ-1-GR (adsorbierte gebundene Rückstände) sind in erster Linie eine Funktion der Extraktionsmethode. Cyclisch wiederholte Behandlung mit verschiedenen Lösungsmitteln sollte letztendlich zu einer quantitativen Extraktion der Typ-1-GR führen, auch wenn das aufgrund des hohen Aufwands experimentell selten erreicht wird. Als Beispiel könnte man das Herbizid Paraquat nennen, das schon nach kurzer Zeit im Boden durch Ionenaustausch an Tonmineralen einen GR bildet. Übliche Extraktionsverfahren liefern nur sehr geringe Ausbeuten. Behandelt man den Boden jedoch mit konzentrierter Säure, so wird auch Paraquat extrahierbar. Typ-2-GR (eingeschlossene Rückstände) sollten erst nach Modifizierung oder Zerstörung der Matrix zugänglich werden. Diese Rückstände bilden wie Typ-1-GR ein echtes Reservoir im Boden, das unter ungünstigen Bedingungen geleert werden kann. Es konnte gezeigt werden [102, 103], daß die Silylierung von Boden zu einer derart grundlegenden Umorientierung der Huminstoffstruktur führt, daß in erheblichem Ausmaß GR (wohl vorwiegend Typ 2) freigesetzt werden. Auch die Quellung von Boden (z.B. durch Zusatz von Wasser) hat einen erheblichen Einfluß auf die Freisetzung von Typ-2-GR. Es kann auch eine Analogie zur meist gewollten Immobilisierung mittels Sol-Gel-Verfahren hergestellt werden.

Typ-3-GR (kovalent gebundene Rückstände) können durch nicht-destruktive Methoden überhaupt nicht extrahiert werden. Auch sie zeigen in der Regel sehr lange Halbwertszeiten. Man könnte sie als stabile Spezies und daher detoxifiziert ansehen. Dies ist jedoch nur bei sehr stabilen Bindungen (C-C) wahrscheinlich. Auch ist es nicht ausgeschlossen, daß auch kovalente Konjugate eine toxische Wirkung ausüben können. Betrachtet man die teilweise recht labilen Konjugate, die z.B. als Hämoglobin-Derivate identifiziert wurden, so können auch viele kovalente Rückstände unter bestimmten Umständen abgespalten werden. Ohne größere Schwierigkeiten gelingt es oft, Typ-3-GR zusammen mit ihrer Matrix zu solubilisieren. So löst sich in basischem Puffer ein großer Teil der Huminstoffe glatt auf – die kovalenten Konjugate bleiben hierbei meist erhalten. Dies hilft für viele analytische Verfahren – im Gegensatz zu immunologischen Methoden – nicht weiter, da die Anzahl der unterschiedlichen Spezies extrem hoch ist. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang Fulvinsäuren, die gut wasserlöslich sind und damit leicht in Gewässer eingetragen werden und damit oft den Löwenanteil des organischen Kohlenstoffs im Wasser ausmachen. Diese Fulvinsäuren können jedoch auch Typ-3-GR darstellen, die z.B. auf einer Ackerfläche gebildet wurden und ausgeschwemmt wurden. Über derartige Stofftransporte ist sehr wenig bekannt, obwohl man vermuten muß, daß GR

den Hauptteil des ausgetragenen Rückstands darstellen. Letztlich soll ein neuer Definitionsversuch unternommen werden, der das oben Diskutierte möglichst einfach zusammenfaßt:

Gebundene Rückstände sind unerwünschte Substanzen, die an polymere, amorphe oder kristalline Materie gebunden sind, so daß sie durch Behandlung mit nicht-destruktiven Lösungsmitteln in üblichen Zeiträumen nicht extrahiert werden können. Es werden adsorbierte, eingeschlossene und kovalent gebundene Rückstände unterschieden.

4.2 Konventionelle Methoden

4.2.1 ^{14}C -Markierung

Die eindeutig dominierende Methode bei der Bestimmung von GR ist die ^{14}C -Markierung³. Hier wird die zu untersuchende Verbindung ^{14}C -markiert z.B. in einem Lysimeterversuch eingesetzt. Es werden Mehrfachmarkierungen und Markierungen in zentralen Bereichen (Kernmarkierung) bevorzugt, damit das markierte Atom bei einer Metabolisierung nicht zu früh verloren geht. Der Vorteil des Verfahrens ist, daß der markierte Kohlenstoff jederzeit wiedergefunden werden kann und eine gute Bilanzierung ermöglicht. Bei der Zulassung von Pestiziden (bzw. Pflanzenschutzmitteln, PSM) wird die ^{14}C -Methode routinemäßig eingesetzt. Sie ist auch hilfreich, Metaboliten des Pestizids zu entdecken. Der Grad der Mineralisierung kann mittels des emittierten $^{14}\text{CO}_2$ abgeschätzt werden. Wie schon diskutiert wurde, kann jedoch die Reassimilierung von CO_2 oder anderen kleinen Bruchstücken des Ausgangsmoleküls eine zu kleine Mineralisierungsrate vortäuschen. Auch ist es mit der radioaktiven Isotopenmarkierung in der Regel nicht möglich, Rückschlüsse auf die chemische Struktur der beteiligten Verbindungen zu ziehen. Eine gewisse Strukturinformation ist über Doppelmarkierungen ($^3\text{H}/^{14}\text{C}$) möglich. So darf sich das Verhältnis nicht ändern, so lange das Molekül weitgehend intakt bleibt. Der als "gebundene Radioaktivität" bezeichnete Summenwert ist aber als *Worst-case*-Abschätzung brauchbar. Alle Typen gebundener Rückstände zusammengenommen, können den Wert für die "gebundene Radioaktivität" nicht signifikant übersteigen.

4.2.2 ^{13}C -Markierung

Eine weitere sehr wertvolle Methode ist die ^{13}C -Markierung im Zusammenhang mit kernresonanzspektroskopischen Untersuchungen (NMR)⁴. Auch hier ist eine spezielle Synthese des markierten Derivats meist unumgänglich. Bedauerlicherweise liegen Bodenproben sowohl in ihrem ^{13}C -Gehalt zu hoch, als auch deren Gehalt an paramagnetischen Verunreinigungen, die die NMR stark stören. Da ein Großteil der Matrix im Boden als Festkörper vorliegt, muß häufig auf die Festkörper-NMR ausgewichen werden. Trotz der unbestrittenen Fortschritte auf dem Gebiet der Festkörper-NMR ist deren Leistungsfähigkeit (Empfindlichkeit, Auflösung) der NMR in Flüssigkeiten bei weitem unterlegen. Der hohe ^{13}C -Hintergrund erfordert es oft, eine ^{13}C -abgereicherte Matrix auf der Basis von

³Auch die Markierung mit Tritium wird gelegentlich eingesetzt.

⁴Die Markierung mit ^{15}N kann gleichfalls NMR-Untersuchungen erleichtern.

^{12}C -angereicherten Substanzen herzustellen. Es ist einleuchtend, daß dies einen ganz erheblichen Aufwand erfordert und nur im kleinsten Labormaßstab durchgeführt werden kann. In den wenigen Fällen, in denen entsprechende Experimente durchgeführt wurden, waren die Ergebnisse aber außerordentlich wertvoll, da strukturelle Aussagen über die molekulare Verknüpfung gemacht werden konnten. Diese Informationen können auch für die Entwicklung von Immunoassays hilfreich sein.

4.2.3 IR-Spektroskopie

In einigen älteren Veröffentlichungen sind Versuche dargestellt, Infrarotspektroskopie zur Untersuchung von GR zu verwenden. Wenn auch gewisse Veränderungen im Spektrum von Huminsäuren registriert wurden, so erwies sich doch sowohl die qualitative als auch quantitative Interpretation als äußerst schwierig. Heute erscheinen manche der Schlußfolgerungen aufgrund der schwachen Datenlage als nicht mehr haltbar oder wenigstens zweifelhaft. Problematisch ist insbesondere das ungünstige Verhältnis zwischen Untergrund und Signal, da bei Huminstoffen fast ein Kontinuum im Spektrum erhalten wird. Die Messung von GR in realen Konzentrationsbereichen erscheint somit utopisch.

4.2.4 Massenspektrometrie

Nur wenige Versuche beziehen sich auf die Verwendung von massenspektrometrischen Methoden. Sowohl mittels Pyrolyse-GC-MS oder SIMS könnte man sich eine Untersuchung von GR vorstellen. Wohl aufgrund der ungünstigen Konzentrationsverhältnisse und hohen Untergrundsignalen wurden bisher keine erfolgreichen Messungen berichtet. Dies bezieht sich auch auf moderne Varianten, wie die MALDI-TOF-MS, die auch in relativ komplexen Mischungen sinnvolle Ergebnisse liefert. Die Tatsache, daß die Versuche Huminstoffe im MALDI-TOF-MS zu untersuchen, nur undeutliche Ergebnisse erbrachten, könnte ein Hinweis darauf sein, daß auch die Vermessung von GR auf Schwierigkeiten stößt. Ursache könnte die starke Absorption von Licht durch Huminstoffe sein und die starken Wechselwirkungen zwischen Huminstoffmolekülen untereinander und mit eingelagerten Analytmolekülen. Damit ist die Voraussetzung einer MALDI-TOF-MS-Messung nicht gegeben, da durch eine Einbettung in eine stark absorbierende Matrix die schwach absorbierenden Analyten isoliert werden sollen. Zudem könnte hier die niedrige Konzentration und niedrige Molmasse der Analyten limitierend sein – eine Anreicherung und ein Clean-up sind ja definitionsgemäß nicht möglich. Kürzlich wurden erste Ergebnisse von APCI-MS/MS-Messungen an gebundenen Rückständen in Bodenhuminsäuren publiziert [104].

4.2.5 Überkritische Extraktion (“Dextraktion“)

Eine der wenigen Methoden, die unter bestimmten Voraussetzungen für die Untersuchung von Realproben geeignet ist, ist die Extraktion mit überkritischen Lösungsmitteln. Hier ist weniger die Verwendung des standardmäßig eingesetzten Kohlendioxids (mit Lösungsmittelmodifiern) gemeint, da diese Methode als sehr mild gelten kann und bestenfalls ähnliche Extraktionsausbeuten liefert, wie eine Soxhlet-Extraktion. Im Gegensatz dazu sind überkritische Lösungsmittel, wie Wasser, Methanol u.a. als ausgesprochen aggressiv einzustufen. Daher

wurde die Verwendung von überkritischem Methanol (150-160 bar und 250 °C) sogar als eine Kombination von Extraktion und Pyrolyse angesehen. Es konnte gezeigt werden, daß überkritisches Methanol zur fast quantitativen Extraktion des radioaktiven Rückstands von ^{14}C -markiertem Atrazin führt. Diese Methode scheint zur weitgehenden "Verflüssigung" des gesamten organischen Materials im Boden zu führen. Weitere Daten zu exakten Wiederfindungen und anderen Verfahrensparametern liegen leider noch nicht vor. So ist es noch unklar, zu welchen chemischen Veränderungen diese als "Dextraktion" [105] bezeichnete Methode bei den Analyten und ihren Metaboliten führt. Auffällig ist jedenfalls, daß ein erheblicher Anteil der Triazine als Form ihrer Methoxyderivate (Atraton u.a.) gefunden werden, die vorher im Boden nicht enthalten waren. Nachteilig wirken sich an der "Dextraktion" Sicherheitsprobleme aus, da bei Undichtigkeiten austretender überhitzter Methanoldampf in der Regel sofort zu einer Explosion führt. Außerdem ist der Clean-up der Extrakte außerordentlich aufwendig, da es sich um tiefbraune, teerähnliche Flüssigkeiten handelt. Nach einer geeigneten Aufreinigung können alle üblichen Verfahren zur Triazinanalytik eingesetzt werden. Bevorzugt werden flüssigkeitschromatographische Trennungen (HPLC) eingesetzt, die in Kombination mit einem Diodenarraydetektor (DAD) auch die Erfassung von hydrophileren Metaboliten (Hydroxy- und Desalkylderivate) erlauben. In Kombination mit radioaktiven Isotopenmarkierungen ist auch der Einsatz von Radiodetektoren für die HPLC hilfreich, da so auch neue Metaboliten/Abbauprodukte aufgefunden werden können. Mit der "Dextraktion" nicht zu verwechseln ist die kommerziell verfügbare "Accelerated Solvent Extraction" (ASE), die zwar mit erwärmten Lösungsmitteln unter Druck arbeitet, aber statisch extrahiert und bei weitem nicht die extremen Bedingungen der "Dextraktion" erreicht.

4.2.6 Elementaranalyse

In manchen Fällen kann auch eine Elementaranalyse Aufschluß über gebundene Rückstände geben. Besonders wenn die interessierende Substanz seltene Elemente (relativ zu der zu untersuchenden Matrix) enthält. Obwohl diese Methode einiges Potential aufweist, wurde sie nur sehr selten angewandt. Natürlich ist der Konzentrationsbereich nach unten sehr beschränkt; in Laborversuchen oder bei der Charakterisierung von synthetischen Konjugaten haben sich diese Methoden durchaus bewährt [106]. So konnte die Kopplungsdichte eines Mercaptotriazins an Huminsäuren sowohl mittels konventioneller CHNS-Analytik (Verbrennung) und durch totalreflektierender Röntgenfluoreszenz (TXRF) anhand der Schwefelgehalte mit sehr guter Übereinstimmung gemessen werden. Für die Anwendung auf Realproben ist jedoch die Konzentration des Analyten i.d.R. viel zu niedrig.

4.2.7 Chemische Spaltung

In gewissem Umfang kann sicherlich die "Dextraktion" als eine partiell spaltende Methode angesehen werden, dies wurde aber bisher im Detail nicht untersucht. Da für lösliche und extrahierbare Analyten eine Vielzahl geeigneter Analysemethoden zur Verfügung stehen, erscheint es nicht abwegig, als ersten Schritt die Abspaltung des kovalent gebundenen Rückstands zu versuchen. In der Lebensmittelanalytik bzw. Klinischen Chemie oder Biochemie sind vergleichbare

Schritte durchaus üblich. So werden in vielen Fällen Sekundärmetaboliten (Glucuronide, Sulfate, Acetate usw.) entweder enzymatisch oder chemisch von der derivatisierenden Gruppe befreit, um den Analyten als Summe aller Spezies leichter bestimmen zu können. Auch die klassische Aminosäureanalyse durch Hydrolyse in 6 N Salzsäure kann als eine ähnliche Methode gelten. Wie man an diesem Beispiel erkennen kann, ist die Zerstörung einiger interessierender Analyten während des Aufschlusses ein ernstzunehmendes und nicht immer lösbares Problem. So treten beim Salzsäureaufschluß von Proteinen systematische Verluste von z.B. Tryptophan auf [107].

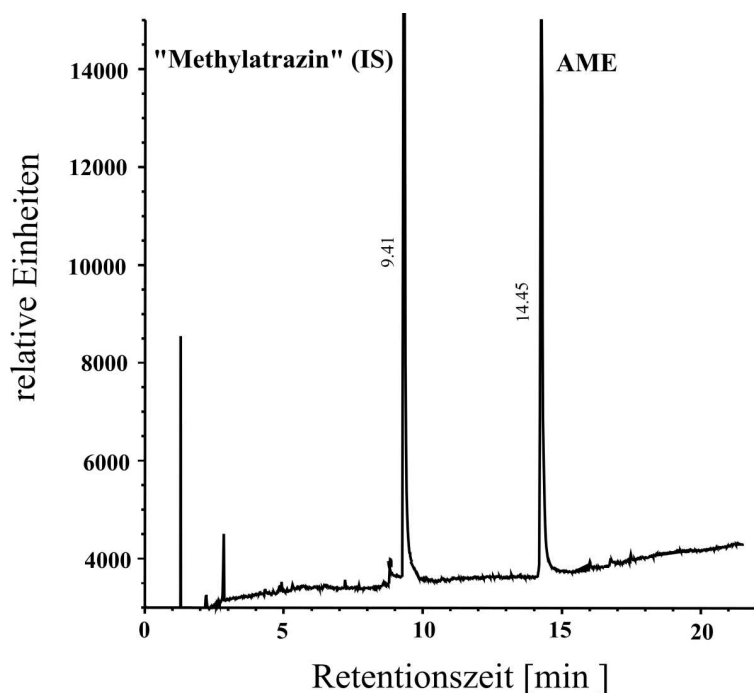


Abbildung 4.2: Gaschromatographische Quantifizierung eines chemisch abgespaltenen Triazinderivats (IS: Interner Standard, AME: "Atrazin-methoxyethanol", aus: [106])

Wie in Abb. 4.2 gezeigt wird, kann eine gezielt auf die Substanzklasse abgestimmte chemische Spaltung ein wertvolles Werkzeug sein, das sogar zur Untersuchung von Realproben geeignet ist [108]. Bei chemisch besonders stabilen Substanzklassen ist die Entwicklung derartiger Methoden erheblich erleichtert, so z.B. bei Triazinherbiziden, chlorierten und nitrierten Aromaten.

4.2.8 Thermische Spaltung

Allgemein schwierig ist jedoch die Abspaltung, wenn eine C-C-Bindung zur Matrix vorliegt. Dies gelingt jedoch unter Umständen mit einer thermischen Behandlung (z.B. Pyrolyse). Es muß jedoch gewährleistet sein, daß die thermische Spaltung einen halbwegs gerichteten Verlauf aufweist, d.h. daß bestimmte Bindungen bevorzugt gebrochen werden. Ansonsten erhält man nur eine große An-

zahl weitgehend unspezifischer Fragmente ohne analytischen Wert. Auch besteht die Gefahr, daß die gewünschten Fragmente unter den harschen Spaltungsbedingungen zu einem großen Teil weiterreagieren und nicht mehr identifizierbar sind. Vorteilhaft ist jedoch der geringe Aufwand und die Möglichkeit, auch Re-alproben untersuchen zu können, selbst wenn die Empfindlichkeit der Methoden oft zu wünschen übrig läßt.

4.3 Immunologische Methoden

4.3.1 Einführung

Eigentlich ist es überraschend, daß die Einführung von immunologischen Methoden bei der Untersuchung von gebundenen Rückständen (GR) so spät erfolgt ist. Einzelne Pionierarbeiten bezogen sich auf das Gebiet der qualitativen Detektion von gebundenen Rückstände in Boden und Pflanzen [109, 110, 111]. Die Entwicklung von (semi-)quantitativen immunologischen Tests für GR oder Versuche, Strukturinformationen zu erhalten, folgten [112]. Die meisten Arbeiten beschäftigten sich mit der Bestimmung von gebundenen Triazinherbiziden, wie Atrazin, im Boden (siehe Abb. 4.3, [108, 113]). Aber auch gebundene TNT-Rückstände (2,4,6-Trinitrotoluol) [114, 115, 116] und gebundene PAH (Polycyclische Aromaten) [117, 118] wurden untersucht.

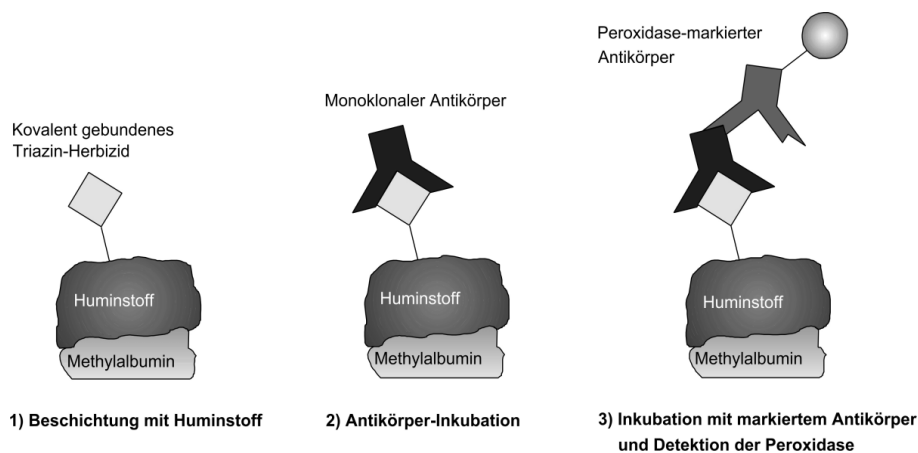


Abbildung 4.3: Schema eines nichtkompetitiven Immunoassays zur Detektion von gebundenen Rückständen am Beispiel von Triazinherbiziden

4.3.2 Standardmaterialien

Auch heute noch sind einige Probleme der Bestimmung von GR nicht gelöst. Besonders negativ wirken sich fehlende Standardsubstanzen und Standardreferenzmaterialien aus. Dadurch ist der Vergleich verschiedener Methoden nur sehr begrenzt möglich. Es ist recht selten, daß in unabhängigen Arbeiten vergleichbare Proben verwendet wurden, die wenigstens eine beschränkte Diskussion über

die Ergebnisse zulassen [119]. Dieser Mangel an Standards führt dazu, daß Standardmaterialien selbst hergestellt und charakterisiert werden müssen. Es zeigte sich, daß dies einen wesentlich größeren Aufwand erfordert als die Testentwicklung selbst, da für jede Substanzklasse neue Charakterisierungsmethoden für die entsprechenden Konjugate entwickelt werden müssen.

Auch die Synthese geeigneter Matrixkonjugate kann nur begrenzt verallgemeinert werden. Häufig müssen neue Kopplungsmethoden erprobt und optimiert werden. Am häufigsten wurde bisher die Kopplung von aktivierten Carbonsäuren (NHS-Ester) an primäre Aminogruppen von Huminsäuren aus frischem Boden angewendet. Die entstehende Amidbindung gewährleistet eine langfristige Stabilität der Konjugate. Da Huminsäuren nur eine limitierte Anzahl an primären Aminogruppen (wahrscheinlich aus Aminosäuren [120, 121]) zur Verfügung stellt, ist die Verwendung einer Huminsäure aus einem frischen Boden (z.B. Kompost) günstig. Es ist anzunehmen, daß mit zunehmender Alterung des Bodens oder der isolierten Huminsäure die Konzentration an primären Aminogruppen durch Vernetzung stark abnimmt⁵. Inwiefern der zugängliche Anteil an gekoppelten Haptenen durch Alterungsvorgänge abnimmt, wurde noch nicht genauer untersucht. Gefriergetrocknete Huminstoff-Konjugate haben sich aber bisher als relativ stabil gezeigt – es gab keine Anzeichen eines Verlusts an Hapten-Aktivität. Auch die häufig aufgeworfene Frage, inwiefern Haptene in GR sterisch unzugänglich sind und daher sich einer Messung entziehen, muß dahingehend beantwortet werden, daß sich in erster Näherung dieser sterische Effekt in der Probe und im Standard gleich auswirkt. Daher ist kein systematischer Fehler durch diesen Effekt zu erwarten. Es konnten bisher keine derartigen Effekte experimentell nachgewiesen werden.

Vorteilhaft bei synthetischen gegenüber natürlichen Konjugaten sind zwei Punkte: Erstens kann die Konzentration des (gebundenen) Analyten in der synthetischen Probe viel höher sein, als normalerweise in einer Realprobe. Und zweitens kennt man den Bindungsmechanismus des Analyten bei der synthetischen Probe aufgrund der bekannten Herstellungsprozedur ziemlich genau. In synthetischen Huminsäurekonjugaten konnten Analytgehalte von über 1% erreicht werden, in den meisten Realproben erscheinen 0.01% als obere Grenze realistisch⁶. Problematisch ist jedoch die Auswahl der Haptenstruktur, die zur Kopplung an die Matrix verwendet werden soll. Idealerweise ist sowohl die Struktur des Haptens, als auch seine Bindung zur Matrix identisch, wie in einem realen GR. Leider sind oft sogar beide Informationen nicht vorhanden, so daß nur Approximationen erreicht werden können. Hilfreich sind in diesem Zusammenhang z.B. Strukturinformationen aus NMR-Messungen [122], Metabolismus-Studien [123, 124] und ähnlichem. Mit Hilfe solcher Daten ist zumindest ein “educated guess“ möglich, welche Substanzen sich gekoppelt als Standard eignen könnten. Die Kreuzreaktionen, die bei vielen Immunoassays als störend empfunden werden, sind hier positiv zu bewerten, da kleinere Strukturabweichungen (besonders an der der Antikörper abgewandten Seite) toleriert werden. Daher muß das zur Kalibrierung verwendete Hapten nicht völlig mit dem in der Realprobe vorliegenden Hapten übereinstimmen. Schwierigkeiten macht die Reinigung des Standardkonjugats, da wie in natürlichen GR auch verschiedene Typen der GR gemischt vorliegen können. Ein Ziel der Konjugatsynthese und Reinigung ist die

⁵In der Tat sind kommerzielle Huminsäuren, die aus Braunkohle gewonnen werden, für NHS-Ester-Kopplungen nicht geeignet (unveröffentlichte Daten).

⁶Extremfälle, wie Bodenproben mit z.B. 10 g/kg TNT, seien hier einmal ausgenommen.

Herstellung eines "einheitlichen" GR im Sinne der definierten GR-Typen. Adsorbierte und eingeschlossene GR können durch wiederholte Soxhlet-Extraktion und daran anschließende Umfällung weitgehend entfernt werden. Es ist aber schwer nachzuweisen, daß wirklich keine derartigen GR in der Standardprobe enthalten sind. Hier helfen auch verschiedene übliche Methoden, wie die ^{14}C -markierte Synthese nicht wirklich weiter, da die gebundene Radioaktivität nicht zwischen den GR-Typen unterscheidet. Ein Monitoring durch NMR könnte im Idealfall eingesetzt werden, da man mit dieser Technik die unterschiedlichen Bindungszustände unterscheiden könnte. Bisher sind aber keine derartigen Arbeiten bekannt. Es wurde auch die Verwendung von kompetitiven Standards (ungekoppeltes Hapten) zur Kalibrierung berichtet [119]. Die von einer gut charakterisierten Reinsubstanz ausgehende Methode leidet aber an einer Unsicherheit der relativen Kreuzreaktionen, die fast immer unbekannt sind. Auch mit Hapten belegte Partikel wurden schon zur Kalibrierung herangezogen [112], bei denen aber die "Konzentration" des Haptens auch relativ unsicher bleibt und daher nur für qualitative Assays herangezogen wurde. Steht eine wie auch immer geartete Referenzanalytik zur Verfügung (z.B. ^{14}C -Methode), so kann man immer auch diese Methode zur Kalibrierung heranziehen. Schwierig ist jedoch die Tatsache, daß hier unterschiedliche GR-Typen verglichen werden und man daher implizit von einem unveränderten Verhältnis dieser Typen ausgehen muß. Dies ist insbesondere bei Proben sehr unterschiedlichen Alters nicht gegeben. Man kann daher nur in eng begrenzten Fällen eine Korrelation erwarten.

4.3.3 Kreuzreaktionen

Wie schon erwähnt, stellen Kreuzreaktionen meist ein Problem bei der Analytik mit immunologischen Methoden dar. Man kann allgemein festhalten, daß eine immunologische Quantifizierung nicht gelingt, wenn die Identität des Analyten nicht unabhängig bestätigt werden kann. Daher liefern entsprechende Analysen genaugenommen immer "Äquivalentkonzentrationen", die spezifisch für einen bestimmten Test gelten und nicht einfach übertragbar bzw. unrechenbar sind. Daher müssen diese Werte i.d.R. als relative Werte verstanden werden. Außerdem sind Kreuzreaktionen (CR) von kompetitiven und nichtkompetitiven Assays nicht identisch. Überraschenderweise existieren kaum vergleichende Untersuchungen über die CR von kompetitiven und nichtkompetitiven Assays. Daher ist bis heute der Zusammenhang zwischen diesen Werten unklar geblieben. Über die Messung von Kreuzreaktionen im nichtkompetitiven Format sind einzelne Publikationen verfügbar [125, 126, 127]. Diese Arbeiten sind jedoch weithin unbekannt geblieben. So kann die Affinitätskonstante einer Antigen/Antikörper-Wechselwirkung mittels immobilisiertem Antigen und einer Antikörperverdünnungsreihe ermittelt werden [128]. Wichtig in diesem Zusammenhang ist, daß das Antigen weder rein zu sein braucht, noch man seine Konzentration kennen muß.

Nun besteht zwischen der Affinitätskonstante und einer Kreuzreaktion ein enger Zusammenhang, man könnte Kreuzreaktionen auch als relative Affinitäten bezeichnen. Kennt man also die Affinitätskonstanten, so lassen sich Kreuzreaktionen in bestimmten Testformaten leicht berechnen. GR können nun als ein Grenzfall dieser Situation angesehen werden. So behandelt man einen kovalenten GR wie ein hochgradig unreines Antigen. Daher sollte sich der in der Literatur gezeigte Weg zur Bestimmung einer Affinitätskonstante auf die Bestimmung der

Kreuzreaktion eines GR anwenden lassen. Setzt man nun eine quantitative Extraktion der GR Typ 1 und 2 voraus, so ließe sich bei bekannter Kreuzreaktion tatsächlich die Konzentration des GR Typ 3 quantitativ bestimmen. Es wäre sogar denkbar, für jede Probe eine individuelle Kreuzreaktion zu bestimmen, um etwaige Änderungen der Bindungsstruktur (z.B. Alterung) zu erfassen.

Um die Zusammenhänge zwischen konventioneller Kreuzreaktion nach ABRAHAM [11] und der Kreuzreaktion nichtkompetitiver Art zu untersuchen, wurden Modellkonjugate von nitroaromatischen Haptenen untersucht [129]. Um die Matrixproblematik zu minimieren, wurde nicht Huminsäure, sondern Serumalbumin (BSA) als Trägermaterial verwendet. Um Störungen durch Multivalenz zu vermeiden, wäre es ideal, reine monovalente Konjugate zu verwenden⁷. Leider gelang die Synthese derartiger Konjugate nur partiell. Als Antikörper wurde ein kommerziell erhältlicher TNT-MAb (Klon A/1.1.1) von SDI Inc., Newark, verwendet⁸. Die verschiedenen Nitroderivate wurden mittels eines direkten, kompetitiven Immunoassays auf ihre Kreuzreaktion untersucht. Schon der Vergleich der drei untersuchten Derivate ist interessant. So führt der formale Verlust einer Nitrogruppe in 6-Position zu einer ca. 20fachen Abnahme der Affinität. Der weitere Verlust einer Nitrogruppe an der äquivalenten Position 2 führt zu einer über 1000fachen Abnahme⁹. Die drei Haptene dienen zur Simulation drei verwandter, aber in der Affinität zu einem Antikörper verschiedener kovalenter GR. Die Kopplungsdichten der BSA-Konjugate wurde UV-VIS-spektroskopisch bestimmt und waren 18, 7 und 11 mol/mol in der in Tabelle 1 angegebenen Reihenfolge. Da die Absorptionsspektren durch die Kopplung signifikant verändert waren, war die Bestimmung der Kopplungsdichten mit einem erhöhten Fehler behaftet. Zuerst wurde versucht, das Verhalten derartiger Derivate numerisch zu simulieren (Annahme: Gleichgewicht). Mit erhöhter Antikörperkonzentration streben die Kurven alle einem Maximum zu, das – dies ist nun der entscheidende Punkt – nicht von der Substanz (und deren Affinität) abhängt. Man sollte also, auch wenn man die CR einer kovalent gebundenen Verbindung nicht kennt, eine Quantifizierung vornehmen können, so lange man den Sättigungsbereich erreichen kann. Dieser Sättigungsassay führt zu einem molaren Summenwert der beteiligten Derivate. Man erhält also ein Ergebnis der Form mol/kg Boden. Die Umrechnung in Gewichtseinheiten (g/kg) gelingt nicht, da die Molmasse der beteiligten Substanzen meist nicht bekannt ist. Zudem wäre die Angabe einer Molmasse eines kovalent gebundenen Rückstands sehr willkürlich, da genau genommen noch ein großes Matrix-Molekül hinzugehört, das aber eine sehr heterogene Molmassenverteilung aufweist. Man könnte jedoch das Ergebnis in formale Massenkonzentrationen einer virtuellen Muttersubstanz umrechnen – z.B. TNT.

⁷Da GR in Realproben in relativ geringer Konzentration vorkommen, ist eine multivalente Situation unwahrscheinlich.

⁸<http://www.sdix.com/> bzw. <http://www.strategicbiosolutions.com/>

⁹Auch das unnitrierte Derivat Phenyl-6-AHA wurde untersucht. Die Kreuzreaktion konnte aber aufgrund der schwachen Bindung mit der verwendeten ELISA-Technik nicht mehr bestimmt werden.

Tabelle 1: Testmittelpunkte und Kreuzreaktionen der verwendeten Haptene (siehe auch: Abb. 4.4)

Bezeichnung	Testmittelpunkt [nmol/L]	Molare CR** %
N-(2,4,6-Trinitrophenyl)-6-AHA*	3.9 ± 0.1	71 ± 7
N-(2,4-Dinitrophenyl)-6-AHA*	87 ± 14	3.2 ± 0.7
N-(4-Nitrophenyl)-6-AHA*	130000 ± 30000	0.0022 ± 0.0007

*Aminohexansäure **Bezogen auf TNT (100%)

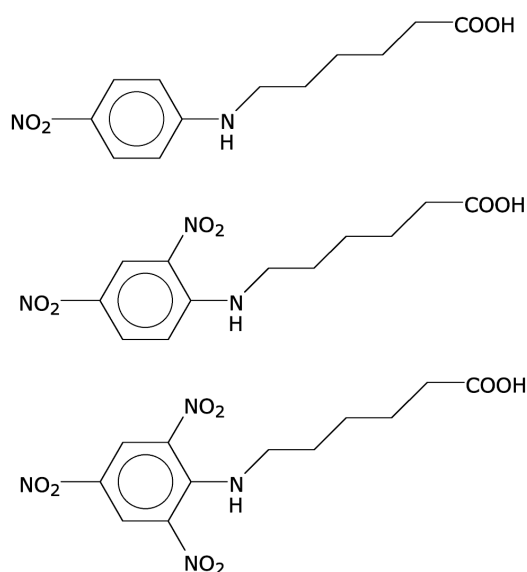


Abbildung 4.4: Strukturformeln der als Hapten verwendeten Nitroaromaten: Mononitrophenyl-Derivat (MNP), Dinitrophenyl-Derivat (DNP), Trinitrophenyl-Derivat (TNP)

Bei einem entsprechenden Versuch, der in Abb. 4.5 gezeigt ist, wurde ein der Theorie partiell entsprechendes Verhalten gefunden. Es ist zu erkennen, daß ein *Cut-off*-Wert der Affinität existiert, unter dem keine Bindung stattfindet, die sich signifikant von der Null-Kontrolle unterscheidet. Diese Grenze scheint irgendwo zwischen 0.0022 und 3.2% CR (zwischen DNP und MNP) zu liegen. Der obere Sättigungswert wird interessanterweise vom DNP-Derivat nicht erreicht. Dies steht in gewissem Widerspruch zu der o.g. Sättigungstheorie. Zunächst könnte man an einen Effekt der unterschiedlichen Kopplungsdichte denken. Berücksichtigt man aber die Größenverhältnisse und die Tatsache, daß ein erheblicher Haptenüberschuß an der Oberfläche vorliegen sollte, so ist diese Erklärung wenig überzeugend. Eine andere Erklärung könnte von einem unterschiedlichen Bindungsmodus ausgehen. So bindet der Antikörper an das TNP-Hapten mit über 20facher Affinität und entsprechend langsamerer Dissoziationsrate. Somit ist eine monovalente Bindung (metastabil) bei hohen Antikörperkonzentrationen denkbar. Das DNP-Hapten würde aufgrund der viel höheren Dissoziation während des Assays in die stabilere bivalente Form umlagern und damit die Menge

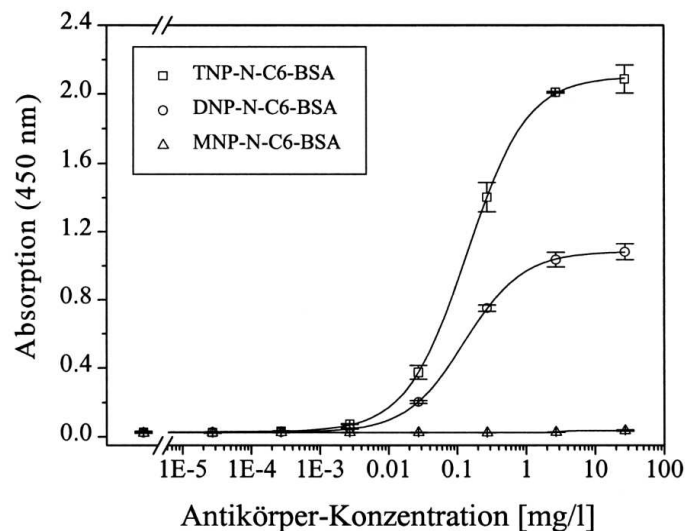


Abbildung 4.5: Sättigungskurven von Hapten-Konjugaten unterschiedlicher Affinität (aus [129])

des gebundenen Antikörpers halbieren. Das ca. 2:1-Verhältnis der maximalen Signale scheint diese Hypothese zu unterstützen. Mit Hilfe eines monovalenten TNT-Antikörpers könnte man diesen Mechanismus eindeutig bestätigen oder widerlegen. Eine andere Hypothese könnte von einer unregelmäßigen Kopplung an das Protein ausgehen. Sollten die Proteinmoleküle nicht ungefähr statistisch koppeln, sondern durch eine lokale Übersättigung eine hohe Kopplungsdichte eines Teils der Proteine verursachen, könnte der niedrigere Grenzwert auch auf einen entsprechenden Anteil nicht gekoppelten BSAs hinweisen. Dies stimmt auch mit der Tatsache überein, daß dieses Konjugat die geringste mittlere Kopplungsdichte aufweist, so daß ungekoppeltes oder sehr gering modifiziertes BSA durchaus enthalten sein könnte. Betrachtet man nun die Maximalsignale der TNP- und DNP-Derivate so ist trotz der gewissen Abweichungen von der Theorie auffallend, daß wie erwartet, die nichtkompetitive CR des DNP viel höher als die kompetitive ist, in diesem Fall 45% (bez. auf TNP) vs. 44%. Man kann also mit Sicherheit sagen, daß nichtkompetitive Assays völlig andere CR zeigen als kompetitive. Berücksichtigt man die experimentellen Unsicherheiten, so ist es wahrscheinlich, daß die Sättigungstheorie auch bei gebundenen Rückständen gilt und damit eine summarische Bestimmung der kovalent gebundenen Rückständen unter Sättigungsbedingungen möglich erscheint.

4.3.4 Unspezifische Bindung (NSB)

Eine der unangenehmsten Erscheinungen bei der Entwicklung und Anwendung von immunologischen Assays für die Detektion von GR ist die sog. unspezifische Bindung (NSB). Dies äußert sich als hohes Hintergrundsignal, das unabhängig von der Analytkonzentration ist. Dies kann sowohl zu falsch positiven als auch zu

falsch negativen Resultaten führen. Ein Hauptproblem scheint die hohe Affinität von Huminstoffen zu Proteinen¹⁰, zu sein (siehe auch [116]). Leider kann eine hohe NSB nicht einfach subtrahiert werden, da je nach Matrix starke Unterschiede gefunden werden. Hochoptimierte Blocking-Prozeduren sind bei entsprechenden Immunoassays notwendig. Die Entwicklung entsprechenden Blockings wird weitgehend empirisch durchgeführt, da die entsprechende Theorie nicht weit genug entwickelt ist. Zum Blockieren von Oberflächen werden meist Proteine oder Proteinmischungen eingesetzt, so Rinderserumalbumin (BSA), Negativserum, Casein, entfettetes Milchpulver, Gelatine, Fischprotein und andere. Auch Blocking-Reagenzien auf synthetischer Basis sind im Gebrauch, so Polyacrylsäure, Tween 20 und Substanzen, deren Zusammensetzung von den Herstellern geheimgehalten werden.

Allen Blocking-Reagenzien gemeinsam ist die Tatsache, daß sie unter bestimmten Umständen hervorragende Ergebnisse zeigen, bei anderen Tests entweder wirkungslos sind oder sogar den Test massiv stören. Ein bestes Blocking-reagenz existiert also nicht. Uneffektives Blocking kann durch zu homogene Blocking-Substanzen hervorgerufen werden. Man vermutet, daß die Lücken zwischen zwei Blocking-Proteinen nicht blockiert werden können, wenn die Größe dieser Lücke kleiner ist als die des Blocking-Proteins. Die Verwendung eines stark heterogenen Blocking-Gemischs umgeht dieses Problem offensichtlich – man erkaufte sich dies aber mit der gesteigerten Möglichkeit von unerwünschten spezifischen Wechselwirkungen mit den Blocking-Komponenten.

Manche Blocking-Komponenten binden auch nicht fest genug an die zu blockierende Oberfläche. Man nimmt an, daß dies z.B. bei Tween 20 der Fall ist. Derartige Reagenzien sollten daher nicht sequentiell, sondern als Additiv verwendet werden – sofern es nicht zu einer Denaturierung einer wichtigen Komponente kommt. Auch die Konzentration und Einwirkdauer einer Blocking-Komponente kann kritisch sein. So führen zu niedrige Blocking-Konzentrationen zu uneffektiver Beschichtung. Dasselbe gilt für zu kurze Behandlungsdauern.

Da die Bindung eines Proteins an eine Oberfläche von langsamen Alterungsschritten gefolgt wird, die meist zu einer Stabilisierung der Oberfläche führen, sollten Blockingschritte auch nicht zu kurz durchgeführt werden. Leider stehen beide Forderungen – hohe Konzentration und lange Blockingdauer – manchmal im Gegensatz zum Ziel der maximalen Erhaltung der Aktivität schon immobilisierter Reagenzien. Auch macht sich die zunehmende Viskosität von konzentrierten Blockinglösungen unangenehm bemerkbar – besonders wenn sie als Additiv eingesetzt werden sollen.

Im Zusammenhang mit GR tritt auch ein anderer unangenehmer Blocking-Effekt auf: Bei vielen sehr effektiven Blockingreagenzien verschwindet die Bindungsfähigkeit der darunterliegenden Schicht vollständig, nicht nur die unspezifischen Wechselwirkungen, auch die spezifischen werden vollständig unterdrückt. Dieser Effekt, als "Totblocken" bekannt, kann als eine sterische Behinderung erklärt werden. Sind die Bindungspartner klein (z.B. Haptene), so besteht die Gefahr, daß sie so effektiv von Blockingproteinen zugedeckt werden, daß keine Zugänglichkeit für Sekundärreagenzien mehr besteht. Dieses Problem kann mit zwei Ansätzen gelöst werden. Entweder verwendet man nur reversibel bindende oder sterisch wenig anspruchsvolle Blockingreagenzien.

¹⁰Die wichtigsten Reagenzien bei Immunoassays sind Proteine.

4.3.5 Verfügbarkeit von Antikörpern

Nicht nur im Bereich der Analyse von GR, auch allgemein in der Umweltanalytik ist die Verfügbarkeit von Antikörpern noch sehr limitierend. Zu dieser Situation tragen einige Faktoren verschärfend bei. So ist die Umweltanalytik – im Vergleich z.B. zur Klinischen Analytik – ein sehr kleiner Markt, der zumindest momentan keine signifikanten Wachstumsraten aufweist. Dies hat dazu geführt, daß die kleine Anzahl an Firmen, die auf diesem Sektor tätig war, einer Konzentrationswelle unterworfen waren, die zeitweise nur noch eine größere Firma¹¹ übrig ließ. Zwar sind inzwischen vorwiegend in den USA Neugründungen zu verzeichnen, die vorangegangenen, wohl krisenbedingten Fusionen haben jedoch gezeigt, daß die Marktbasis noch sehr dünn ist. Diese Situation führte dazu, daß bis vor kurzem überhaupt keine brauchbaren umweltrelevanten Antikörper kommerziell verfügbar waren. Die hohen Kosten der Antikörperentwicklung schienen den Firmen nur durch den Verkauf von Testkits [130] amortisierbar, die eine beträchtliche Gewinnspanne beinhalten. Die Reagenzien selbst blieben unter Verschluß und waren nicht nach wissenschaftlichen Kriterien charakterisiert. Dies scheint sich ganz langsam zu ändern [131], die grundlegende Limitierung bleibt aber wohl noch lange erhalten.

Die überwiegende Last der Neuentwicklungen wurde von universitären Gruppen, z.B. [47, 59, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145], getragen. Einzelne Antikörper wurden von Konzernen, wie der Ciba-Geigy AG, Basel, primär für interne Zwecke entwickelt [146, 147]. Nachteilig an dieser Situation hat sich die mangelnde Kontinuität der universitären Projekte herausgestellt, die u.a. durch die zunehmende Abhängigkeit von einer Drittmittelfinanzierung hervorgerufen wird. Dies führt zu der unerwünschten Situation, daß schon entwickelte Antikörper nicht (mehr) verfügbar sind und durch teure Mehrfachentwicklungen in ähnlicher Form wieder hergestellt werden müssen. Auch im industriellen Umfeld hergestellte Antikörper scheinen nicht gesichert zu sein, da sie oft nicht als Produkt angesehen werden. So scheinen die Klone der Ciba-Geigy "verloren" gegangen zu sein, nachdem die betreffende Arbeitsgruppe aufgelöst wurde. Bei anderen Firmen ist die Situation noch schlechter, da dort hergestellte Antikörper meist nicht das Licht der Öffentlichkeit erblicken und dauerhaft unter Verschluß gehalten werden. Auch in diesen Fällen ist eine Mehrfachherstellung nicht zu vermeiden. Auch die weit verbreitete Gewohnheit, für seltener gebrauchte Antikörper auf (billigere) polyklonale auszuweichen, hat sich langfristig als Bumerang herausgestellt, da die Seren zwangsläufig aufgebraucht werden und sämtliche Charakterisierungsarbeit mit dem Verschwinden des Serums weitgehend obsolet wird.

Bedenkt man, daß die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers hoher Qualität auch heute noch 1-2 Jahre dauert und Kosten von mindestens 50.000 € verursacht, wird klar, wieviele Ressourcen durch die unkoordinierte Antikörperherstellung unnötig gebunden werden. Auch die Charakterisierung und Qualitätskontrolle der meisten kommerziell angebotenen Antikörper entspricht nicht einmal rudimentären analytischen Erfordernissen [148]. Die Datenblätter sind meist vollkommen unbefriedigend. Eine ausführliche *In-house*-Kontrolle ist daher bei jedem Kunden erforderlich, was zusätzliche Ressourcen bindet. Zudem sind die Preisvorstellungen der Firmen oft geradezu prohibitiv¹².

¹¹Strategic Diagnostics, Inc. (SDI), Newark, USA

¹²Preise von 2500 € pro Milligramm Antikörper sind keine Seltenheit. Man mache sich

Anwendungen, wie Affinitätsanreicherungen oder nichtkompetitive Assays kommen oft schon aus Kostengründen nicht in Frage. Dies ist umso ärgerlicher, da heute sehr effektive Methoden zur präparativen Herstellung von monoklonalen Antikörpern (MAbs) zur Verfügung stehen – die noch viel produktiveren rekombinanten Systeme noch nicht einmal berücksichtigt. Dies führt natürlich zu geringen Umsätzen und damit wiederum zu noch geringeren Investitionen der Firmen. Dieser Teufelskreis ist eine wichtige Ursache, daß die entsprechenden immunanalytischen Systeme heute weder in ihrer Qualität, noch im Kostenbereich dem harten Wettbewerb am analytischen Markt gewachsen sind. Bezüglich der Forschung im Umfeld der GR bedeutet dies, daß nur ein minimales Angebot geeigneter Antikörper zur Verfügung steht und daher sich die Arbeiten zwangsläufig an diesem Angebot orientieren müssen. Daher ist es nicht verwunderlich, daß auch die hier vorgestellten Immunoassays zur Detektion von GR bisher nur sehr begrenzte Verbreitung gefunden haben.

4.3.6 Solubilisierung von kovalent gebundenen Rückständen

Nach der obigen Definition erscheint dieser Zwischentitel ein Widerspruch in sich selbst. Zwar können kovalent gebundene Rückstände ohne destruktive chemische Eingriffe tatsächlich nicht extrahiert werden, eine Solubilisierung gemeinsam mit der Matrix ist aber durchaus realisierbar. Besonders in der Bodenanalytik ist die Extraktion von Huminsäuren und Fulvinsäuren eine Standardprozedur. Mit verdünnter Natronlauge oder Natriumpyrophosphatpuffer können erhebliche Mengen des organischen Kohlenstoffs aus dem Boden herausgelöst werden. Vorausgesetzt, daß diese Extraktionsbedingungen weder zur Abspaltung noch zur Zerstörung des GR führen, erhält man so eine Lösung eines kovalent gebundenen Rückstands. Es muß jedoch beachtet werden, daß auch adsorbierte oder eingeschlossene Rückstände auf diese Weise freigesetzt werden können und damit die Lösung sowohl kovalent gebundene Rückstände, als auch gelöste oder adsorbierte Rückstände enthalten kann. Eingeschlossene Rückstände sollten bei dieser Prozedur weitgehend freigesetzt worden sein. Wurde die Bodenprobe vor der Huminstoff-Extraktion nicht vorbehandelt (z.B. durch mehrfache Soxhlet-Extraktion), so ist natürlich auch ein Großteil der löslichen Rückstände im Extrakt enthalten. Diese Tatsache ist wichtig beim Vergleich kompetitiver und nichtkompetitiver Assays. Auch andere Solubilisierungsverfahren könnten – je nach Matrix – zur Anwendung kommen. So könnte man bestimmte Matrices enzymatisch auflösen (z.B. biologisches Material [149, 150]) oder mit speziellen chemischen Reagenzien solubilisieren (z.B. Silylieren [102, 103]). Es ist nicht zwangsläufig notwendig, die Matrix vor ihrer Analyse zu solubilisieren. So werden immunhistochemische Verfahren mit Dünnschnitten von biologischem Gewebe durchgeführt. Die Schwierigkeiten, derartige Assays auch nur halbquantitativ durchzuführen, sind aber beträchtlich. Immunoassays zur Detektion von GR direkt in unbehandeltem Boden durchzuführen, sind bisher nicht erfolgreich gewesen.

einmal bewußt, daß Gold (ca. 10 €/Gramm) 250.000 mal billiger ist! Die Produktionskosten eines gereinigten monoklonalen Antikörpers belaufen sich momentan (2000) auf ca. 5-50 € pro Milligramm, je nach Maßstab.

4.3.7 Kompetitive Immunoassays

Solubilisierete gebundene Rückstände können ähnlich wie andere lösliche Analyten direkt in kompetitiven Immunoassays untersucht werden. Als Vorteil kann angesehen werden, daß die Empfindlichkeit des Assays weitgehend des üblichen kompetitiven Tests entspricht, d.h. im Idealfall im unteren ppt-Bereich liegt. So elegant und einfach das Konzept auch erscheinen mag, so schwierig ist die Durchführung im Detail. Im vorherigen Abschnitt wurde schon diskutiert, daß die Solubilisierung von Huminstoffen zwar möglicherweise eine Extraktion von ungespaltenen kovalent gebundenen Rückständen ermöglicht, nicht jedoch eine quantitative Abtrennung von löslichen oder erst durch die Solubilisierung löslich gemachten Rückständen (Typ 1 oder 2) garantiert. Dies führt dazu, daß mehrere kreuzreagierende Spezies unterschiedlichen Ursprungs im Solubilisat enthalten sind. Folglich ist das gemessene Signal eine Überlagerung der Inhibitionen der verschiedenen Spezies. Da deren Konzentrationen und Konzentrationsverhältnisse stark schwanken können, ist eine Umrechnung i.d.R. nicht statthaft, besonders da nicht bekannt ist, welcher Anteil wirklich der Immunoassaymessung zugänglich ist. Erschwerend kommt hinzu, daß die Kreuzreaktionen der kovalent gebundenen Rückstände normalerweise nicht bekannt sind, obwohl Versuche unternommen wurden, diese zu messen [119].

Die sterischen Verhältnisse kovalent gebundener Rückstände sind bis heute ungeklärt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Bindungsverhältnisse extrem heterogen sind und im Extremfall kein Molekül dem anderen gleicht. Es ist daher auch schwierig einen passenden Standard für kompetitive Messungen zu finden, sofern man sich nicht mit relativen Werten zufrieden gibt. Auch kompetitive Assays für GR leiden an den starken Wechselwirkungen zwischen Huminstoffen und Proteinen und erfordern sorgfältige Blockingstrategien. Auch wenn aufgrund von statistischen Überlegungen vermutet werden kann, daß multivalente GR selten sind, so gibt es noch keine grundlegenden experimentellen Arbeiten zu diesem Thema. Dies ist relevant, da multivalente Konjugate eine stark erhöhte Affinität zu (multivalenten) Antikörpern zeigen und daher eine kompetitive Messung verfälschen können. Eine gewisse Verbesserung der Situation könnte man mit einer unabhängigen Bestimmung der (scheinbaren) Affinitätskonstante des realen GRs erreichen, um eine Kreuzreaktionskorrektur vorzunehmen [151]. Bisher wurde dieses Konzept aber noch nicht realisiert.

4.3.8 Nicht-kompetitive Immunoassays

Eine neue Möglichkeit der Untersuchung von GR wurde mit der Anwendung von nichtkompetitiven "Sandwich"-Immunoassays gefunden. Auch die ersten Versuche GR immunologisch nachzuweisen, beruhten auf einem nichtkompetitiven Assay (siehe Abb. 4.3). Sandwich-Immunoassays basieren auf der Bindung von zwei unabhängigen Antikörpern an zwei Epitope (Bindungsregionen) des Analyten. Notwendigerweise muß der entsprechende Analyt mindestens zwei Epitope aufweisen – dies erzwingt normalerweise eine Mindestmolmasse. Haptene, also kleine Moleküle, können daher mit dem üblichen Sandwich-Immunoassay nicht untersucht werden. Im Gegensatz zu kompetitiven Immunoassays, bei denen die Inhibition eines Blank-Signals ausgewertet wird, das zu einer negativen Kalibrierkurvensteigung führt, werden bei nichtkompetitiven Assays konzentrationsproportionale Signale erhalten (siehe Abb. 4.6).

Aus mechanistischen Gründen, auf die hier nicht im Detail eingegangen werden kann [152], zeigen nichtkompetitive Assays einige grundsätzliche Vorteile, so daß sie in der Regel den kompetitiven Assays vorzuziehen sind. So sind nichtkompetitive Assays empfindlicher, da mit Reagenzüberschuß gearbeitet werden kann und daher das Gleichgewicht auf die Seite des Komplexes verschoben werden kann. Die bei kompetitiven Assays fast unüberwindliche Affinitätslimitierung tritt in dieser Form nicht auf. Sandwich-Assays sind dagegen primär hintergrundlimitiert, was den erhöhten Blockingbedarf erklärt. Auch die Selektivität von Sandwich-Immunoassays kann den kompetitiven Assays deutlich überlegen sein. Dies ist auf die Kombination der Selektivitäten zweier Antikörper zurückzuführen, das zu einer formalen "Multiplikation" der Kreuzreaktionen führt. Ist also einer der Faktoren näherungsweise Null, so ist auch das Produkt Null. Da Sandwich-Immunoassays auf zwei Epitope pro Analytmolekül angewiesen sind, zeigt sich auch eine andere Art der Selektivität. So sind bei GR von kleinen Analyten (das sind fast alle umweltanalytisch interessanten Stoffe) die Messung der löslichen Eduktkomponente im Sandwich nicht möglich. Diese Assays sind daher relativ unempfindlich gegenüber einer Anwesenheit derartiger Kontaminationen. Auch adsorbierte oder eingeschlossene GR (Typ 1 und 2) können so nicht detektiert werden. Dies führt zu einer sehr hohen Selektivität in Richtung kovalent gebundener Rückstände (Typ 3), ohne Störung von anderen Rückständen. Interessant ist die Tatsache, daß es bisher nicht gelungen ist, einen nichtkompetitiven Assay zur Detektion von GR "umzudrehen", d.h. zuerst den haptenspezifischen Antikörper zu immobilisieren, dann die huminstoffhaltige Probe zu inkubieren, und in einem dritten Schritt ein Reagenz an den Huminstoff zu binden. Dies hängt vermutlich mit dem wenig selektiven Bindungsmechanismus aller an Huminstoffen bindenden Proteinen zusammen. Dieses "Umdrehen" hätte entscheidende Empfindlichkeitsvorteile, da bei dem jetzt benutzten Format der weitaus größte Teil der immobilisierten Huminstoffmoleküle keinen GR darstellt und daher Oberfläche verschwendet.

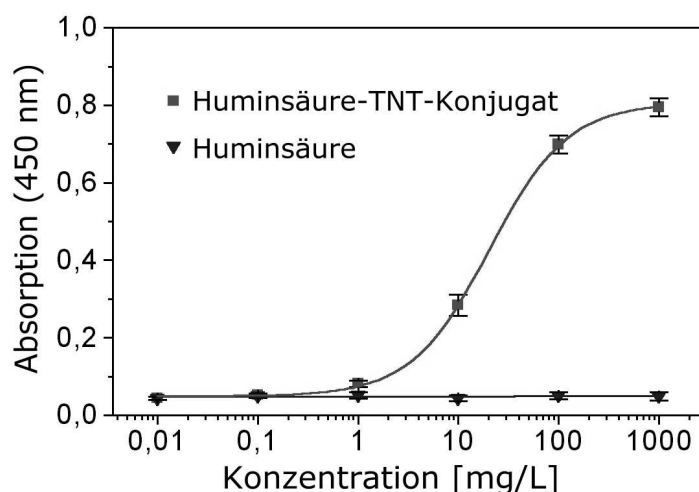


Abbildung 4.6: Kalibrierkurven eines nichtkompetitiven Immunoassays zur Detektion von kovalent gebundenen "Trinitrotoluol"-Derivaten

4.3.9 Direkte Detektion von Haptenen

Es sei hier ein kleiner Exkurs zur Diskussion von Hapten-Immunoassays genutzt, die auf nichtkompetitiven Mechanismen beruhen. Allgemein wird angenommen, daß Haptene nur in kompetitiven Assay gemessen werden können. Dies ist jedoch nicht ganz richtig. So behaupten bestimmte Autoren, daß kleine Moleküle auf Mikrotiterplatten (MTP) binden und mit entsprechenden Antikörpern detektiert werden können. Die Daten scheinen auf eine geringfügige Bindung hinzuweisen, wobei der Mechanismus noch vollkommen unklar ist. So käme z.B. ein kovalenter Schritt in Frage. Dies würde voraussetzen, daß kommerzielle MTP chemisch reaktive Gruppen an der Oberfläche aufweisen. Diese Möglichkeit ist nicht von der Hand zu weisen, auch wenn dazu Beweise fehlen. Dieser Mechanismus würde zu GR des Typs 3 führen. Es ist jedoch auch eine nicht-kovalente Bindung der Haptene z.B. über Salzbrücken denkbar. Auch wenn das einzelne Hapten vermutlich eine sehr geringe Affinität zur Oberfläche aufweist, so könnte die konzertierte Aktion verschiedener Haptene im Zusammenhang mit einem multivalenten Bindungsmechanismus zu einer meßbaren Gesamtaffinität führen. Auch dieser Mechanismus, der GR des Typs 1 entsprechen würde, ist unbewiesen. Auch ein Depot von gelösten Haptenen im Kunststoff wäre denkbar, wobei man jedoch sterische Probleme vermuten muß. Dieser Mechanismus würde ungefähr GR des Typs 2 entsprechen.

Eine besondere Variante, die in unserem Labor durch Zufall durchgeführt wurde, ist die Reaktion mit Blocking-Proteinen. So führte ein Assay auf Trinitroaromaten zu stark positiven Signalen, so lange die verwendete Huminsäure nicht mehrfach von Resten der zur Kopplung eingesetzten Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) gereinigt wurde. Die Inkubation mit der TNBS-kontaminierten Probe führte zu einer *in-situ*-Derivatisierung der Blocking-Proteine, deren Modifizierung immunologisch leicht nachweisbar war.

Ein Versuch zur Herstellung von adsorptiv gebundenen Rückständen (Typ 1) durch Inkubation von 1 g/kg TNT in Standardboden zeigte jedoch trotz 5-tägiger Alterung kein signifikantes Signal. Ähnliche Ergebnisse erhielt man auch mit Atrazin-gespikten Bodenproben bei einer Alterungsdauer von mehreren Monaten. Diese Experimente unterstreichen auch die Wichtigkeit von natürlichen Bedingungen bei der Bildung von GR. Es ist schwierig, im Labor entsprechende Bedingungen zu simulieren. Obwohl die Ursachen dieser Komplikationen noch unklar sind, kann vermutet werden, daß kovalent gebundene Rückstände (Typ 3) über einen biologisch/biochemischen Mechanismus gebildet werden. Eine Ausnahme sind wahrscheinlich nur chemisch reaktive Stoffe, wie z.B. Anilazin [153].

Die genannten Experimente machen es daher unwahrscheinlich, daß adsorptiv gebundene Rückstände im nichtkompetitiven Format nachgewiesen werden können, bzw. den Nachweis von kovalent gebundenen Rückständen (Typ 3) stören. Ein völlig anderes Assayformat zur nichtkompetitiven Detektion von Haptenen wurde schon 1990 von AREFYEV et al. [53] bzw. 1993 von GUNARATNA et al. [56] publiziert. Dieses Verfahren wurde kürzlich wieder aufgegriffen und für die Messung von Kokain verwendet [54, 55]. Man stellt möglichst monovalente, fluoreszenzmarkierte Antikörper her und inkubiert diese mit der Probe. Die Mischung wird dann über eine Säule mit immobilisiertem Hapten geschickt, die freie Antikörper quantitativ bindet (siehe Abb. 4.7). Nur Antikörper mit einem gebundenen Analyten können die Säule passieren und werden anhand ihrer Markierung detektiert. Vorteilhaft ist die schnelle Kinetik und die formale

Abkopplung von der Affinitätslimitierung, da mit einem Antikörperüberschuß gearbeitet werden kann. Nachteilig ist der enorme Antikörperverbrauch und die Notwendigkeit, hochreine, voll aktive Konjugate herzustellen. Für Details sei auf die Literatur [154] verwiesen.

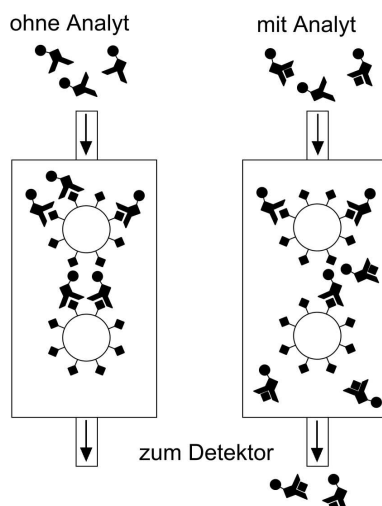


Abbildung 4.7: Nichtkompetitiver Assay für kleine Moleküle (Haptene)

4.3.10 Huminsäureantikörper

Zum Aufbau eines Sandwich-Immunoassays sind, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, meist zwei Antikörper gegen zwei räumlich nicht überlappende Epitope notwendig. Aus diesem Grund wurde für die Detektion von huminstoffgebundenen Rückständen (Typ 3) versucht, Antikörper gegen Huminstoffe herzustellen [155]. Es wurden Konjugate aus Huminsäure und Schlüsselochschnecken-Hämocyanin (KLH) synthetisiert und Kaninchen immunisiert. Trotz einer scheinbar positiven Immunantwort und einer erfolgreichen Anwendung des Serums in Huminsäureassays, konnte die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Kreuzreaktionsuntersuchungen¹³ zeigten ein ungewöhnliches Muster – viele Huminsäuren hatten überraschenderweise eine sehr ähnliche CR – unabhängig von ihrer Verwandtschaft zu der zur Immunisierung verwendeten Huminsäure. Spätere Untersuchungen zeigten, daß die genannten Assays nicht unbedingt auf einer Antikörper/Antigen-Wechselwirkung, sondern wahrscheinlich auf einer allgemeineren Protein/Huminsäure-Wechselwirkung beruht, die offensichtlich sehr stark sein kann und vergleichbare Affinitäten aufweisen dürfte.

Es konnte nun gezeigt werden, daß die Bindungsstärke zwischen Protein und Huminsäure vom isoelektrischen Punkt (IP) des Proteins abhängt. Auch die Ionenstärke des Puffers hat einen deutlichen Einfluß – die stärkste Bindung von Huminstoffen mit Proteinen tritt in deionisiertem Wasser auf. Dieses Verhalten läßt sich am einfachsten erklären, wenn man ionische Wechselwirkungen als

¹³Unveröffentlichte Daten

dominierend annimmt. Ähnliche Komplexe bilden anionische mit kationischen Polymeren. Die starke Abhängigkeit von der Ionenstärke des Mediums ist sehr typisch für derartige Interaktionen. Aus dieser Erkenntnis heraus wurden Assays entwickelt, die diese Wechselwirkung optimal nutzen. Es hat sich gezeigt, daß tatsächlich Proteine mit niedrigem IP (wie Rinderserumalbumin, BSA) nur schwache Bindungen zu Huminstoffen ausbilden, wogegen Proteine mit hohem IP (z.B. Histone) sehr stark binden und hervorragend zur Verwendung in entsprechenden Bindungsassays geeignet sind. Es wurde daher ein "Sandwich"-Immunoassay entwickelt, bei dem ein Antikörper (der sog. Fängerantikörper) durch ein ionisch bindendes Protein ersetzt wurde. Die Anwendung eines Huminsäure-Antikörpers wurde daher überflüssig. Auch andere Test zeigten keine deutlichen Hinweise auf Huminsäureantikörper in den entsprechenden Kaninchenserum. Ob prinzipiell keine Huminsäureantikörper gebildet werden können, ist heute noch unbekannt. Man kann aber vermuten, daß die extreme Heterogenität der Huminstoffe eine gezielte Antikörperbildung im Körper verhindert. Auch kann man annehmen, daß keine charakteristischen Epitope in Huminsäuren vorhanden sind, da dies sonst zur Bildung von Antikörpern geführt hätte. Dies unterstreicht wiederum die enorme strukturelle Heterogenität von Huminstoffen.

Die allgemein recht starken Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Huminstoffen erklären auch einige Schwierigkeiten bei der Entwicklung von Immunoassays gegen Huminstoff-Konjugate, da fast alle wichtigen Reagenzien eines Immunoassays Proteine sind. Auch die Tatsache, daß viele Immunoassays zur Messung von Umweltschadstoffen Probleme mit verschiedensten Matrices haben, ist nun aus der Sicht der starken Huminstoff/Protein-Wechselwirkungen leicht erklärbar. Auch eine Hypothese der Huminstoffanfälligkeit von Immunoassays kann nun formuliert werden: Antikörper, die an oder in der Nähe ihrer Bindungsstellen basische Gruppen (Lysine, Arginine etc.) aufweisen, sollten anfälliger gegenüber einer Huminstoffmatrix sein. Dagegen sollten negativ geladene Aminosäuren (Glutaminsäure, Asparaginsäure etc.) einen positiven Einfluß durch Coulomb'sche Abstoßung zeigen. Dies zeigt auch einen Weg zum Design "matrixfester" Antikörper auf: Durch gezielte Punktmutationen sollten sich erhebliche Verbesserungen ergeben. Auch die N-Termini, die ja zwangsläufig in der Nähe der Bindungsstelle liegen, entpuppen sich nun als potentielle Problemstelle. Eine posttranslationale oder synthetische Blockierung könnte hier Abhilfe schaffen. Eine eher empirische Vorgehensweise wurde schon vor einiger Zeit mit dem Zusatz hoher Konzentrationen an Proteinen gefunden [156]. Auch dieser Mechanismus wird nun klarer. Der Zusatz an Begleitprotein führt also weniger zu einer direkten Stabilisierung der Reagenzien, als eher zu einer Maskierung/Komplexierung der Huminstoffe, die dann nicht mehr an die Reagenzien binden können.

4.3.11 Primärantikörper

Die beiden analytischspezifischen Antikörper in einem Sandwich-System werden üblicherweise als Primärantikörper bezeichnet. In den realisierten Assays zur Detektion kovalenter GR sind dies i.d.R. die haptenbindenden Antikörper im oberen Teil des Sandwiches. Es kommen hier polyklonale, monoklonale oder rekombinante Antikörper in Frage, die jeweils entweder als multivalent oder

monovalent¹⁴ vorliegen können. Polyklonale Antikörper haben den Vorteil, daß sie häufig eine hohe Affinität aufweisen und durch ihre Heterogenität manchmal eine höhere Bandbreite an Strukturen erkennen. Dies liegt nicht daran, daß polyklonale Antikörper höhere Kreuzreaktionen aufweisen, sondern an der Tatsache, daß sie aus einer Mischung unterschiedlicher Spezies bestehen. Polyklonale Antikörper sind auch preisgünstiger herzustellen und sind oft stabiler im Bezug auf eine längerfristige Lagerung. Leider hat sich im Laufe der Experimente mit Huminstoffkonjugaten gezeigt, daß es Probleme mit der Selektivität der Bindung gibt. Dies macht sich als "unspezifische Bindung" bemerkbar, wobei es wahrscheinlich eher um unerwünschte spezifische Bindungen handelt. Dies ist insofern erklärlich, daß sowohl Antiseren als auch Huminstoffe aus einer sehr hohen Anzahl an Spezies bestehen. Es ist daher durchaus wahrscheinlich, daß bestimmte Komponenten zufällig eine meßbare Affinität aufweisen. Dies zeigt sich auch daran, daß Blockingversuche nur sehr begrenzte Wirkung aufweisen.

Sehr viel weniger Probleme dieser Art zeigen monoklonale Antikörper. Daher ist es aus dem jetzigen Wissensstand heraus empfehlenswert, nichtkompetitive Immunoassays für die Detektion von GR (Huminstoff-Matrix) nur auf der Basis von monoklonalen (oder rekombinanten) Antikörpern aufzubauen. Obwohl noch kaum experimentelle Daten vorliegen [157], kann vermutet werden, daß sich auch Monovalenz günstig auswirkt. Besonders bei Quantifizierungsversuchen vereinfacht sich das System durch monovalente Reagenzien erheblich. Bei der Verwendung "echter" Sandwich-Immunoassays kann sich ungünstig auswirken, daß MAbs meist nur aus der Spezies Maus zur Verfügung stehen. Sollen zwei Maus-MAbs eingesetzt werden, so muß einer der beiden markiert werden, entweder direkt mit einem Enzym oder anderen Label, oder mit Biotin zur Verwendung mit Streptavidin/Marker-Konjugaten, die kommerziell erhältlich sind. Wie schon im Abschnitt "Huminsäureantikörper" erwähnt, werden hauptsächlich basische Proteine als Ersatz für die Fängerantikörper eingesetzt – der untere Primärantikörper wurde also durch ein anderes Protein ersetzt.

4.3.12 Sekundärantikörper

Den meist kommerziell bezogenen Sekundärantikörpern wird oft wenig Aufmerksamkeit zuteil. Gerade bei Assays für GR ist dies aber nicht gerechtfertigt, da ungeeignete Sekundärantikörper zu verschiedensten Problemen führen können. Diese haben in den meisten Fällen mit unspezifischer Bindung (NSB) zu tun. Viele Sekundärantikörper werden auf der Basis von polyklonalen Antikörpern hergestellt. In diesem Fall ist es dringend anzuraten, affinitätsgereinigte, speziell gegen den Fc-Teil der Maus-Antikörper gerichtete Antikörper-Konjugate zu verwenden. Noch besser sind monoklonale Antikörper, sofern man sicherstellen kann, daß sie die gewünschte Immunglobulin-Klasse auch wirklich binden. Direkt vergleichbare Untersuchungen über unterschiedliche Markierungen liegen m.W. nicht vor. Da einige Assays auf der Basis von Meerrettichperoxidase (HRP) erfolgreich aufgebaut wurden, kann man annehmen, daß diese Markierung keine signifikanten Probleme verursacht. Da die Sekundärantikörper das entsprechende Label, z.B. Meerrettichperoxidase (HRP), enthalten, ist auf die Stabilisierung der Enzymaktivität zu achten.

¹⁴Aus polyklonalen und monoklonalen Antikörpern (meist bivalent) können durch Spaltung monovalente Fragmente, z.B. Fab-Fragmente hergestellt werden.

HRP hat zwar einen sehr schnellen enzymatischen Umsatz, leider ist es schwierig, die Enzymaktivität über längere Zeit stabil zu halten. In einer Arbeit zur Stabilisierung von Reagenzien für die Verwendung in Biosensoren wurde gezeigt [158], daß mit dem Ausschluß von Sauerstoff die Aktivität von HRP langfristig erhalten werden kann. Ist ein völliger Sauerstoffausschluß nicht erreichbar, so können auch Additive eine äquivalente Wirkung haben. Es ist durchaus sinnvoll, diese Stabilisierungsmaßnahmen in allen Assays mit Peroxidase-Markierung routinemäßig einzusetzen. Nur so kann die maximale Enzymaktivität über die Dauer des Tests weitgehend erhalten bleiben. Das während der Substratentwicklung verwendete Wasserstoffperoxid wirkt sich sehr negativ auf die Enzymaktivität der HRP aus, da es zur vollständigen Inaktivierung des aktiven Zentrums vermutlich über eine doppelte Oxidation des Porphyrin-Eisens führt. Aus diesem Grund muß bei HRP-Assays ein Kompromiß zwischen der Umsatzgeschwindigkeit (möglichst Sättigung) und der Inaktivierungsgeschwindigkeit (möglichst niedrige H_2O_2 -Konzentration) gefunden werden. Eine hohe Konzentration des reduzierenden Substrats wirkt sich positiv aus, ist aber durch die Löslichkeit des betreffenden Substrats und dessen Kosten limitiert.

Markierte Sekundärantikörper werden durch die kovalente Kopplung von HRP an die betreffenden gereinigten Antikörper¹⁵ hergestellt. Dazu stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung [90], homobisfunktionelle Reagenzien, wie die einstufige oder zweistufige Glutaraldehyd-Methode, die Kopplung mit heterobisfunktionellen NHS-Ester-Maleimid-Crosslinkern in Kombination mit reduzierten Antikörpern¹⁶, 2-Iminothiolan (TRAUT's Reagenz) oder N-Succimidyl-S-acetylthioacetat (SATA). Auch reduktive Aminierungen werden eingesetzt, so wird in einer ersten Stufe der Kohlenhydratteil von HRP mit Periodat zu Aldehyden oxidiert. In einem zweiten Schritt, mit Hilfe von Natrium(cyan)borhydrid, werden die Aldehyde mit Aminogruppen des Antikörpers reduktiv aminiert (Alkylierung der Aminogruppen).

Die meisten dieser Verfahren führen zu relativ komplexen Produktgemischen. Diese aufzureinigen ist zwar prinzipiell möglich, wird aber im kommerziellen Umfeld wohl selten angewendet. Problematisch ist die relativ schlechte Reproduzierbarkeit vieler Kopplungsverfahren, die nicht selten stark von den individuellen Eigenschaften der gekoppelten Antikörper abhängt. Daher ist von einer erheblichen Chargen-Variabilität auszugehen, die sich nicht selten in überraschenden Ergebnissen bei einem Chargenwechsel niederschlägt. Neu erhaltene Sekundärantikörper-Konjugate sollten daher vor dem Einsatz einer Qualitätskontrolle unterworfen werden. Wie alle Peroxidase-Reagenzien dürfen HRP-Konjugate nicht mit Natriumazid "stabilisiert" werden¹⁷, da Azid einen starker Inhibitor für HRP darstellt.

4.3.13 Quantifizierung

Das Problem der Quantifizierung von gebundenen Rückständen (GR) hängt eng mit dem Problem der Kreuzreaktionen (CR) zusammen (siehe Seite 79) und ist stark vom benutzten Testformat abhängig. Bei kompetitiven Assays ist nur eine Quantifizierung möglich, wenn die CR der beteiligten Spezies, inklusive

¹⁵Eine effektive und schnelle Reinigungsmethode von vielen Antikörpern ist die Affinitätsreinigung mit Protein A, G oder L.

¹⁶Antikörper mit partiell gespaltenen Disulfid-Brücken.

¹⁷Eine Alternative ist z.B. Thymol.

der Standardkonjugate bekannt ist. Im Abschnitt Kreuzreaktionen wurde eine Arbeit erwähnt, die zur Bestimmung der CR einer Realprobe führen könnte. Inwiefern dies realisierbar ist oder durch die Anwesenheit von unterschiedlichen Spezies gestört wird, muß erst noch untersucht werden. Natürlich ist es jederzeit möglich, eine "Quantifizierung" auf der Basis von Äquivalenten durchzuführen, wie es z.B. in einer Publikation von DANKWARDT et al. gezeigt wird [119]. Es bleibt jedoch ein Korrekturfaktor unbekannt, der aus den fehlenden Kreuzreaktionen herrührt. Würde es gelingen, eine unabhängige Methode der Bestimmung der GR parallel durchzuführen, so ließe sich dieser Faktor nachträglich einführen und für Proben ähnlicher Zusammensetzung verwenden. Als Vergleichsmethode kommen z.B. ^{14}C - oder ^3H -Methoden, eine "Dextraktion" oder andere spezielle Spaltungsmethoden in Frage. Nachteilig ist jedoch, daß ggf. unterschiedliche Spezies miteinander verglichen werden. Es ist also nur in eng umgrenzten Fällen mit einem direkten Zusammenhang der Verfahren zu rechnen.

Bei nichtkompetitiven Assays werden nach dem jetzigen Wissensstand nur kovalent gebundene Rückstände erfaßt. Auch hier wäre eine Kalibrierung mit einer unabhängigen Vergleichsmethode denkbar. Durch die strikte Beschränkung auf Typ-3-GR ist jedoch eine noch größere Diskrepanz zwischen den meisten Vergleichsmethoden und den nichtkompetitiven Assays zu erwarten. Nur unter der Voraussetzung, daß das Verhältnis der GR der Typen 1, 2 und 3 sich nicht signifikant ändert, ist eine Anwendung dieser externen Kalibrierung sinnvoll. Es ist jedoch zu erwarten, daß z.B. durch Alterungsvorgänge sich insbesondere diese Verhältnisse charakteristisch ändern. Die im Abschnitt Kreuzreaktionen vorgeschlagene Sättigungsmethode würde diese Probleme weitgehend lösen, da direkt auf ein Standardkonjugat kalibriert würde und Bedingungen gewählt werden (starker Antikörper-Überschuß), die zu einer Konvergenz der CR der verschiedenen GR-Spezies führen. Dies ermöglicht es, einen molaren Summenwert aller kreuzreagierenden, kovalent gebundenen Spezies anzugeben.

4.3.14 Verbesserte Quantifizierung durch Inhibitionstests

Obwohl optimiertes Blocking eine signifikante Verbesserung der NSBs bei nichtkompetitiven Immunoassays erbracht hat, läßt sich die verbliebene unspezifische Bindung bei spurenanalytisch orientierten Tests nicht vernachlässigen. Auch mit Hilfe von unbelasteten Vergleichsproben läßt sich das Problem nicht wirklich lösen, da Bodenextrakte eine sehr starke Variabilität aufweisen. Dies führt dazu, daß fast jeder Extrakt eine unterschiedliche NSB aufweist – folglich können diese "Blank"-Werte nicht subtrahiert werden. In erster Linie führt diese Unsicherheit zu einer Erhöhung der Nachweisgrenze. Da jedoch ein sensitiver Nachweis in Realproben unabdingbar ist, wurden Maßnahmen gesucht, die zu einer Verbesserung führen könnten. Sog. Inhibitionstests wurden als wirksamste Maßnahme identifiziert [108]. Hier wird jede Probe einer doppelten Analyse unterzogen. Dem in Abb. 4.3 gezeigten "Sandwich"-Immunoassay und zusätzlich einem analogen Test, bei dem aber vor der Zugabe des analytspezifischen Antikörpers eine relative hohe Konzentration des freien Analyten (oder eines Derivats) zugegeben wird (siehe Abb. 4.8). Dies führt zur Blockade des Antikörpers an der Antigen-Bindungsstelle und einer vollständigen Inhibition der analytspezifischen Bindung. Das resultierende Restsignal ist ein Maß für die NSB. Da dieser Wert mit Hilfe der zu untersuchenden Proben selbst gewonnen wurde, ist in diesem Fall die Subtraktion statthaft.

Die geringfügige Störung des Systems durch die Analytzugabe (Inhibitor), kann durch die Zugabe unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen untersucht werden. Im Normalfall erhält man keine Abhängigkeit des Signals von der Konzentration des zugegebenen Inhibitors, vorausgesetzt eine Mindestkonzentration wird eingehalten. Mit diesem Kunstgriff konnte z.B. die Analyse von kovalent gebundenem "Atrazin" mit einer Nachweisgrenze von 35 µg pro kg Boden (gerechnet als Atrazin) durchgeführt werden (Abb. 4.9).

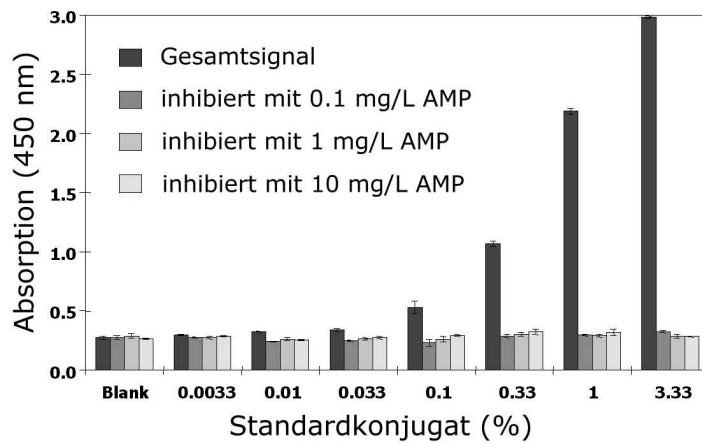


Abbildung 4.8: Inhibitionstest mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen (AMP: "Atrazin-mercaptopropionsäure")

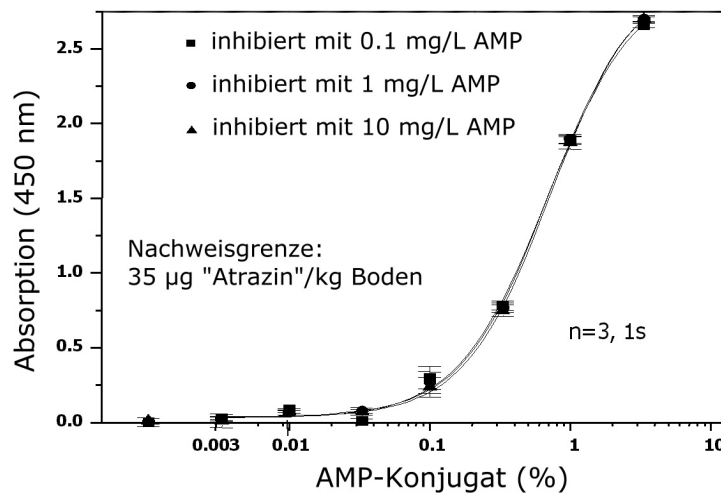


Abbildung 4.9: Inhibitionstest bei der Quantifizierung von kovalent gebundenem "Atrazin" [108]

4.3.15 Probleme der Quantifizierung

In den meisten Assays zur Bestimmung von GR muß die Matrix (im Boden meist Huminstoffe) irgendwie solubilisiert werden. Für Humin- und Fulvinsäuren gelingt dies noch mit relativ milden Reagenzien, z.B. neutralem Pyrophosphatpuffer. Humine, die in diesem Fall als Rückstand verbleiben, können jedoch nur unter drastischen Bedingungen gelöst werden (siehe z.B. Abschnitt *Dextraktion*, Seite 74). Es ist jedoch bekannt, daß Humine eine wichtige Matrix für GR darstellen. Es gibt nun zwei Hauptmethoden, die Gesamtmenge der GR im Boden zu bestimmen. Erstens kann man eine Gleichverteilung der GR in verschiedenen Huminstofffraktionen annehmen. Bestimmt man nun z.B. den Gesamtkohlenstoff (TOC) im Boden und Bodenrückstand, so kann man aus den auf GR untersuchten Huminstofffraktionen auf die Gesamtmenge hochrechnen. Diese Methode wurde in einfacher Form schon in einer der ersten Publikationen zum Thema angewendet [113]. Eine genauere Untersuchung bzw. Validierung dieser Methode steht aber noch aus.

Die zweite Methode beruht auf dem schon erwähnten Sättigungsassay. Das Ergebnis ist in diesem Fall nicht von der Menge bzw. Konzentration der extrahierten Huminstoffe abhängig. Es muß nur gewährleistet sein, daß eine Mindestmenge Huminstoffe gelöst werden konnte und in Form einer "Monolayer" auf die Mikrotiterplatte gebracht werden kann. Man erhält nun nicht eine Konzentration, sondern genau genommen eine Kopplungsdichte. Wenn dies die gewünschte Information ist, sind alle weiteren Korrekturen/Kalibrierungen überflüssig. Wenn ein Absolutwert benötigt wird, kann genau wie oben eine Normalisierung auf den Kohlenstoffgehalt durchgeführt werden. In manchen Fällen ist auch die Bestimmung der Huminsäurekonzentration im Extrakt notwendig, so z.B. für kompetitive Assays. Diese kann z.B. durch Verbrennung, gravimetrisch nach Gefriertrocknung, oder durch UV/VIS-Spektrometrie ermittelt werden, wobei letztere zwar die ungenaueste, aber auch schnellste Methode darstellt. Im Fall von ^{14}C - oder anders radioaktiv isotopenmarkiertem Material, kann natürlich auch die Radioaktivität als Maß für die Extraktionsausbeute dienen. Leider ist dieses Verfahren aus verständlichen Gründen auf Realproben nicht übertragbar.

4.3.16 Strukturaufklärung

Schon die sehr ausgeprägte Selektivität (CR-Muster) vieler Antikörper ermöglicht es, über die Struktur der untersuchten GR konkrete Angaben zu machen. Doch erst bei der Anwendung mehrerer Antikörper erscheint es angebracht, von Strukturaufklärung mittels Immunoassay zu sprechen. Dies könnte ähnlich ablaufen, wie z.B. von SCHNEIDER et al. 1992 publiziert wurde [17]. Später wurde von WINKLMAIR et al. [25] ein System mit vier monoklonalen Antikörpern auf einem Biochip vorgestellt und zur Identifizierung von Triazinherbiziden herangezogen. Bei der Anwendung auf kovalente GR muß jedoch berücksichtigt werden, daß bei nichtkompetitiven Assays die CR bei hohen Antikörperkonzentrationen konvergieren und daher weitgehend ihre strukturelle Aussagekraft verlieren. Hier ist die Anwendung kompetitiver Assays günstiger, da deren CR direkter mit deren Affinitätskonstanten verknüpft sind.

Es wurde schon ein 3-Antikörper-System vorgestellt, um die Struktur von gebundenen Triazin-Herbiziden zu untersuchen [112]. Da von den drei Antikörpern nur einer positive Signale lieferte, war eine vorsichtige Zuordnung der

kovalent gebundenen Triazine möglich. Diese Strukturzuordnung stimmt übrigens mit der Hypothese der Bildung von kovalenten Triazinrückständen über Glutathion-Konjugate überein, die auch konsistent mit der Bindung des von uns verwendeten Antikörpers ist. Kürzlich wurde eine Arbeit über das BASF-Fungizid Kresoxim-Methyl publiziert [159]. Der Autor benutzte drei unterschiedliche Antiseren gegen drei Metaboliten des Fungizids. Nur einer der postulierten GR konnte in Realproben detektiert werden. Dies kommt einer Strukturaufklärung mit immunologischen Mitteln nahe. Für die Quantifizierung wurde angenommen, daß die Standardkonjugate dieselbe CR aufweisen wie die realen Rückstände.

4.3.17 Applikationen

Auch praktische Anwendungen konnten für die immunologische Bestimmung von gebundenen Rückständen demonstriert werden. So konnte in Kooperation mit einer Gruppe am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in Stuttgart ein biologischer Anaerob/Aerob-Abbau von TNT in Boden analytisch begleitet werden. Hierbei zeigte sich, daß die Konzentration der löslichen Nitroaromaten nicht mit der Konzentration der gebundenen Rückstände korreliert. Das Monitoring nur der löslichen Substanzen würde den Abbauerfolg zu optimistisch einschätzen. Mit Hilfe eines Immunoassays konnte gezeigt werden (siehe Abb. 4.10), daß für die weitgehende "Zerstörung" der gebundenen Rückstände signifikant längere Behandlungszeiten erforderlich sind [160].

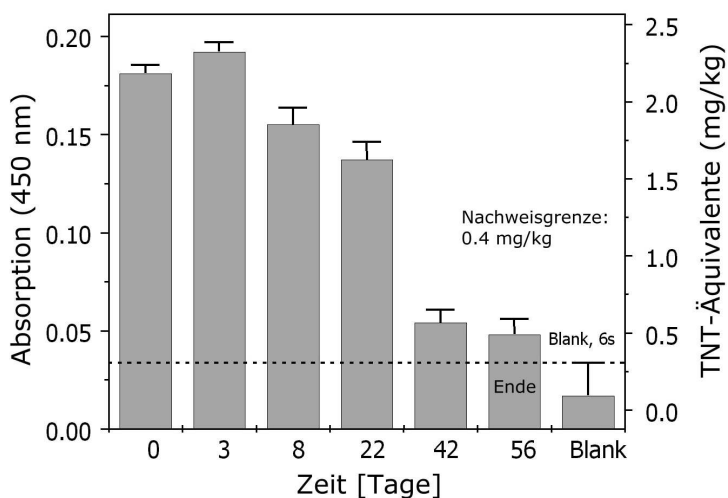


Abbildung 4.10: Abbaukurve von gebundenen TNT-Rückständen während eines biologischen Sanierungsversuchs

Kapitel 5

Zusammenfassung

Immunologische Verfahren gewinnen in der Umweltanalytik zunehmend an Bedeutung. So ist jetzt zunehmend nicht nur eine Entwicklung von "einfachen" ELISAs für neue Analyten zu verzeichnen, sondern auch eine erhebliche Verbreiterung der Methodenvielfalt, die zur Erschließung immer neuer Anwendungen führt. Als einer der wichtigsten Trends in der immunologischen Analytik kann die Entwicklung von Multianalytverfahren gelten. Bisher galten Immunoassays auf Einzelstoffe oder Summenparameter beschränkt. Diese Limitierung kann als überwunden angesehen werden. Die Forschung auf dem Gebiet der sog. Biochips hat hier schon heute völlig neue analytische Möglichkeiten aufgezeigt.

Neue Zielgruppen erschließen jedoch auch stark vereinfachte Schnelltests, von denen besonders Teststreifen attraktiv sind. Es konnte gezeigt werden, daß sich die Anforderungen Sensitivität und einfache Anwendung nicht ausschließen. Es wurde ein Teststreifen für Wasseranalysen vorgestellt, der Nachweisgrenzen von 1 ppb für Trinitrotoluol erreicht und keinerlei Reagenzien und Geräte benötigt. Dieses sog. "Dip-and-Read"-Prinzip könnte dazu führen, daß die Umweltanalytik nicht nur eine kleine Nische weniger spezialisierter Laboratorien bleibt, sondern für breite Bevölkerungsschichten erschwinglich, anwendbar und damit im täglichen Leben nutzbar wird.

Die immunologische Analyse von gebundenen Rückständen z.B. im Boden zeigt, daß die Immunanalytik nicht nur eine Konkurrenz zu bestehenden Verfahren darstellt, sondern auch völlig neue analytische Bereiche erschließen kann, die sich bisher der Meßbarkeit entzogen hatten. Der breite Nachweis von strukturell wenig veränderten, aber kovalent gebundenen organischen Stoffen im Boden kann auch zu einer Veränderung des Verständnisses vieler Vorgänge im Boden führen. So kann man diese kovalente gebundenen Rückstände als ein "chemisches Gedächtnis" des Bodens ansehen, das Jahrzehnte überdauern kann. Die Bewertung solcher Rückstände muß zunächst einmal zurückgestellt werden, bevor keine detaillierteren Untersuchungen zur Toxizität auch der gebundenen Rückstände selbst und deren Leaching-Stabilität vorliegen.

Kapitel 6

Ausblick

Aufgrund der rasanten Entwicklung in den meisten immunanalytischen Bereichen fällt es schwer, besonders interessante Bereiche hervorzuheben. Wie schon mehrfach erwähnt, erfreuen sich Array-Technologien und andere multianalytische Methoden stark zunehmenden Interesses. Aufgrund des frühen Entwicklungsstadiums vieler Systeme ist eine Bewertung noch kaum möglich. Die potentiellen Anwendungen sind jedoch Legion und daher ist mit entsprechenden Anstrengungen zu rechnen, auch kommerzielle Systeme zu entwickeln. Ein interessantes Forschungsgebiet ist auch die Entwicklung von immunchromatographischen oder immunoelektrophoretischen Systemen [154]. Diese stark komplementären Methoden führen bei einer Kombination zu erheblichen Synergieeffekten. Überraschenderweise sind jedoch nur wenige Möglichkeiten dieser Kopplungen ausreichend untersucht worden, ein weites Feld der analytischen Forschung öffnet sich hier. Komplexe analytische Fragestellungen in Zusammenhang mit extremen Matrices können von derartigen Kopplungen besonders profitieren.

Literaturverzeichnis

- [1] S Arrhenius. *Immunochemie*. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1907.
- [2] K Landsteiner. *Die Spezifität der serologischen Reaktionen*. Julius Springer Verlag, Berlin, 1933.
- [3] O Hofstetter, H Hofstetter, V Schurig, M Wilchek, and B S Green. Chiral discrimination using an immunosensor. *Nature Biotechnol*, 17:371–374, 1999.
- [4] O Hofstetter, H Hofstetter, M Wilchek, V Schurig, and B S Green. Antibodies can recognize the chiral center of free α -amino acids. *J Amer Chem Soc*, 120:3251–3252, 1998.
- [5] R P Ekins. The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin Chim Acta*, 5:453–459, 1960.
- [6] S A Berson and R S Yalow. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, 184:1648–1649, 1959.
- [7] E Engvall, K Jonsson, and P Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta*, 251:427–434, 1971.
- [8] E Engvall and P Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) - Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem*, 8:871–874, 1971.
- [9] G Köhler and C Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495–497, 1975.
- [10] R Niessner. Immunoassays in environmental analytical chemistry: Some thoughts on trends and status. *Anal Meth Instrument*, 1:134–144, 1993.
- [11] G E Abraham. Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 β . *J Clin Endocrin Metabol*, 29:866–870, 1969.
- [12] D W Watts and J M Novak. Evaluation of atrazine positive and false positive immunoassay detections in groundwater. *J Environ Sci Health*, B32:659–671, 1997.

- [13] K Ebert. *Validierung von Immunoassay Test-Kits für die Bestimmung von Polycyclischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen im Boden zum Einsatz bei der Erfassung und Bewertung von Altlasten*. Dissertation, Technische Universität München, 2000.
- [14] L C Waters, A Palausky, R W Counts, and R A Jenkins. Experimental evaluation of two field test kits for the detection of PAHs by immunoassay. *Field Anal Chem Technol*, 1:227–238, 1997.
- [15] A Schütz. *Möglichkeiten und Strategien zum immunologischen Nachweis von polychlorierten Biphenylen (PCBs) - Entwicklung eines Summentests*. Diplomarbeit, Technische Universität München, 1996.
- [16] A J Schuetz, M G Weller, and R Niessner. A novel method for the determination of a PCB sum value by enzyme immunoassay to overcome the cross-reactivity problem. *Fresenius J Anal Chem*, 363:777–782, 1999.
- [17] R J Schneider, L Weil, and R Niessner. Identification of two triazine herbicides in top soil layers using immunoassays of different selectivity. *Fresenius J Anal Chem*, 343:145–146, 1992.
- [18] M G Weller, L Weil, and R Niessner. Directed suppression of cross-reactivities in immunoassays by pH-variation (poster). In *Analytica Conference 96*, pages 453–453, München, 1996.
- [19] G Stangl, M G Weller, and R Niessner. Increased sensitivity and selectivity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of atrazine by use of non-ionic surfactants. *Fresenius J Anal Chem*, 351:301–304, 1995.
- [20] W F M Stöcklein, M Rohde, G Scharte, O Behrsing, A Warsinke, B Michael, and F W Scheller. Sensitive detection of triazine and phenylurea pesticides in pure organic solvent by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): Stabilities, solubilities and sensitivities. *Anal Chim Acta*, 405:255–265, 2000.
- [21] A J Schütz. *Entwicklung und Automatisierung eines indirekten Immunsensorarrays zur parallelen Bestimmung von Umweltschadstoffen im Wasser*. Dissertation, Technische Universität München, 1999.
- [22] A J Schuetz, M Winklmaier, M G Weller, and R Niessner. Multianalyte detection with an affinity sensor array. In *Bioluminescence and Chemiluminescence - Perspectives for the 21st Century, Proc. 10th Intern. Symp. 1998, Bologna*, pages 67–70. John Wiley & Sons, Chichester, 1999.
- [23] M G Weller, A J Schuetz, M Winklmaier, and R Niessner. Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water. *Anal Chim Acta*, 393:29–41, 1999.
- [24] M Winklmaier. *Entwicklung eines direkten, multianalytfähigen Immunsensorarrays zur parallelen Bestimmung kreuzreagierender Triazinherbizide*. Dissertation, Technische Universität München, 1999.

- [25] M Winklmaier, A J Schuetz, M G Weller, and R Niessner. Immunochemical array for the identification of cross-reacting analytes. *Fresenius J Anal Chem*, 363:731–737, 1999.
- [26] B Hock. Immunochemical assay of environmental pollutants using pesticides as an example. In *Immunological detection of pesticides and their metabolites in the water cycle*, pages 3–24. VCH, Weinheim, 1995.
- [27] T E Plowman, J D Durstchi, H K Wang, D A Christensen, J N Herron, and W M Reichert. Multiple-analyte fluoroimmunoassay using an integrated optical waveguide sensor. *Anal Chem*, 71:4344–4352, 1999.
- [28] D J Harrison, K Flury, K Seiler, Z Fan, C S Effenhauser, and A Manz. Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis based chemical analysis system on a chip. *Science*, 261:895–897, 1993.
- [29] M G Weller, A J Schütz, M Winklmaier, and R Niessner. Highly parallel affinity sensor system for the detection of water contaminants. In *7th Japanese-German Workshop on Waste Water and Sludge Treatment*, volume 3580, pages 100–109, Kyoto, 1997. PWRI.
- [30] A Brecht, A Klotz, C Barzen, G Gauglitz, R D Harris, G R Quigley, J S Wilkinson, P Sztajn bok, R Abuknesha, J Gascon, A Oubina, and D Barcelo. Optical immunoprobe development for multiresidue monitoring in water. *Anal Chim Acta*, 362:69–79, 1998.
- [31] E Mallat, C Barzen, A Klotz, A Brecht, G Gauglitz, and D Barcelo. River analyzer for chlorotriazines with a direct optical immunosensor. *Environ Sci Technol*, 33:965–971, 1999.
- [32] T O Joos, M Schrenk, P Hopfl, K Kroger, U Chowdhury, D Stoll, D Schorner, M Durr, K Herick, S Rupp, K Sohn, and H Hammerle. A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis*, 21:2641–2650, 2000.
- [33] S Koch, H Wolf, C Danapel, and K A Feller. Optical flow-cell multichannel immunosensor for the detection of biological warfare agents. *Biosens Bioelectron*, 14:779–784, 2000.
- [34] R L Edelstein, C R Tamanaha, P E Sheehan, M M Miller, D R Baselt, L J Whitman, and R J Colton. The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents. *Biosens. Bioelectron.*, 14:805–813, 2000.
- [35] C A Rowe-Taitt, J P Golden, M J Feldstein, J J Cras, K E Hoffman, and F S Ligler. Array biosensor for detection of biohazards. *Biosens Bioelectron*, 14:785–794, 2000.
- [36] J J Cras, C A Rowe-Taitt, D A Nivens, and F S Ligler. Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization. *Biosens Bioelectron*, 14:683–688, 1999.
- [37] A Collioud, J F Clémence, M Sängler, and H Sigrist. Oriented and covalent immobilization of target molecules to solid supports: Synthesis and application of a light-activatable and thiol-reactive cross-linking reagent. *Bioconjugate Chem*, 4:528–536, 1993.

- [38] W Adam, D Reinhardt, and C R Saha-Möller. From the firefly bioluminescence to the dioxetane based (AMPPD) chemiluminescence immunoassay: A retroanalysis. *Analyst*, 121:1527–1531, 1996.
- [39] N W Barnett, R Bos, S W Lewis, and R A Russell. Postulation of a phenoxyl radical intermediate as the species responsible for the background emission observed with certain peroxyoxalate chemiluminescence reagents. *Anal Commun*, 34:17–20, 1997.
- [40] S Albrecht, H Brandl, and W Adam. Chemilumineszenz-Reaktionen. *Chemie in unserer Zeit*, 24:227–238, 1990.
- [41] L J Kricka. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin Chem*, 37:1472–1482, 1991.
- [42] T Porstmann and S T Kiessing. Enzyme immunoassay techniques an overview. *J Immunol Meth*, 150:5–21, 1992.
- [43] S Beck and H Köster. Applications of dioxetane chemiluminescent probes to molecular biology. *Anal Chem*, 62:2258–2270, 1990.
- [44] A P Schaap, H Akhavan, and L J Romano. Chemiluminescent substrates for alkaline phosphatase: Application to ultrasensitive enzyme-linked immunoassays and DNA probes. *Clin Chem*, 35:1863–1864, 1989.
- [45] N Flaherty. Charging ahead. *Opto & Laser Europe*, 78:23–26, 2000.
- [46] Princeton Instruments. *Catalog of high performance digital CCD cameras*. Roper Scientific, Inc., Trenton, NJ, USA, 1994.
- [47] M Winklmeier, M G Weller, J Mangler, B Schlosshauer, and R Niessner. Development of a highly sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides. *Fresenius J Anal Chem*, 358:614–622, 1997.
- [48] P Y K Cheung, L M Kauvar, E Engqvist-Goldstein, S M Ambler, A E Karu, and L S Ramos. Harnessing immunological cross-reactivity: Use of pattern recognition to classify molecular analogs. *Anal Chim Acta*, 282:181–192, 1993.
- [49] G Jones, M Wortberg, B D Hammock, and D M Rocke. A procedure for the immunoanalysis of samples containing one or more members of a group of cross-reacting analytes. *Anal Chim Acta*, 336:175–183, 1996.
- [50] M Wortberg, G Jones, S B Kreissig, D M Rocke, S J Gee, and B D Hammock. An approach to the construction of an immunoarray for differentiating and quantitating cross-reacting analytes. *Anal Chim Acta*, 319:291–303, 1996.
- [51] M Wortberg, S B Kreissig, G Jones, D M Rocke, and B D Hammock. An immunoarray for the simultaneous determination of multiple triazine herbicides. *Anal Chim Acta*, 304:339–352, 1995.
- [52] G J Reimer, S J Gee, and B D Hammock. Comparison of a time-resolved fluorescence immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of atrazine in water. *J Agric Food Chem*, 46:3353–3358, 1998.

- [53] A A Arefyev, S B Vlasenko, S A Eremin, A P Osipov, and A M Egorov. Flow-injection enzyme immunoassay of haptens with enhanced chemiluminescence detection. *Anal Chim Acta*, 237:285–289, 1990.
- [54] C G Bauer, A V Eremenko, A Kühn, K Kürzinger, A Makower, and F W Scheller. Automated amplified flow immunoassay for cocaine. *Anal Chem*, 70:4624–4630, 1998.
- [55] A V Eremenko, C G Bauer, A Makower, B Kanne, H Baumgarten, and F W Scheller. The development of a non-competitive immunoenzymometric assay of cocaine. *Anal Chim Acta*, 358:5–13, 1998.
- [56] P C Gunaratna and G S Wilson. Noncompetitive flow injection immunoassay for a hapten, α -(difluoromethyl)ornithine. *Anal Chem*, 65:1152–1157, 1993.
- [57] T Hara, K Nakamura, S Satomura, and S Matsuura. Noncompetitive immunoassay of thyroxine using a liquid-phase binding assay. *Anal Chem*, 66:351–354, 1994.
- [58] M Winklmaier, A J Schuetz, M G Weller, and R Niessner. New regeneration method for competitive immunosensors. In *Bioluminescence and Chemiluminescence - Perspectives for the 21st Century*, Proc. 10th Intern. Symp., Bologna 1998, pages 134–137. John Wiley & Sons, Chichester, 1999.
- [59] M G Weller. *Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden*. Dissertation. Technische Universität München, München, 1993.
- [60] A P Abel, M G Weller, G L Duveneck, M Ehrat, and H M Widmer. Fiber-optic evanescent wave biosensor for the detection of oligonucleotides. *Anal Chem*, 68:2905–12, 1996.
- [61] B Goldstein and C Wofsy. Why is it so hard to dissociate multivalent antigens from cell-surface antibodies? *Immunol Today*, 17:77–80, 1996.
- [62] O Sonntag. *Trockenchemie - Analytik mit trägergebundenen Reagenzien*. Thieme, Stuttgart, 1988.
- [63] C Heiss. *Entwicklung von Teststreifen für die TNT-Bestimmung auf der Basis eines Apoenzym-Reaktivierungsimmunosassays (ARIS)*. Diplomarbeit, Technische Universität München, 1998.
- [64] A G Verstraete, F M Belpaire, and G G Leroux-Roels. Diagnostic performance of the EMIT-tox benzodiazepine immunoassay, FPIA serum benzodiazepine immunoassay, and radioreceptor assay in suspected acute poisoning. *J Anal Tox*, 22:2732., 1998.
- [65] B Oswald, F Lehmann, L Simon, E Terpetschnig, and O S Wolfbeis. Red laser-induced fluorescence energy transfer in an immunosystem. *Anal Biochem*, 280:272–277, 2000.

- [66] U Schobel, H J Egelhaaf, A Brecht, D Oelkrug, and G Gauglitz. New-donor-acceptor pair for fluorescent immunoassays by energy transfer. *Bioconj Chem*, 10:1107–1114, 1999.
- [67] U Schobel, H J Egelhaaf, D Frohlich, A Brecht, D Oelkrug, and G Gauglitz. Mechanisms of fluorescence quenching in donor-acceptor labeled antibody-antigen conjugates. *J Fluoresc*, 10:147–154, 2000.
- [68] J Raba and H A Mottola. Glucose oxidase as an analytical reagent. *Crit Rev Anal Chem*, 25:1–42, 1995.
- [69] J P Comer. Semiquantitative specific test paper for glucose in urine. *Anal Chem*, 28:1748–1750, 1956.
- [70] B E P Swoboda. The mechanism of binding of flavin-adenine dinucleotide to the apoenzyme of glucose oxidase and evidence for the involvement of multiple bonds. *Biochim Biophys Acta*, 175:380–387, 1969.
- [71] B E P Swoboda. The relationship between molecular conformation and the binding of flavin-adenine dinucleotide in glucose oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 175:175, 1969.
- [72] H J Hecht, H M Kalisz, J Hendle, R D Schmid, and D Schomburg. Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol*, 229:153–172, 1993.
- [73] H J Hecht, D Schomburg, H Kalisz, and R D Schmid. The 3D structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Implications for the use of GOD as a biosensor enzyme. *Biosens Bioelectron*, 8:197–203, 1993.
- [74] A Zeck, M G Weller, and R Niessner. Characterization of a monoclonal TNT-antibody by measurement of the cross-reactivities of nitroaromatic compounds. *Fresenius J Anal Chem*, 364:113–120, 1999.
- [75] M Mayr. *Schnelltests für die Untersuchung von Altlasten auf TNT - Entwicklung eines Apoenzym-Reaktivierungsimmoassays (ARIS)*. Dissertation, Technische Universität München, 1998.
- [76] A Saleh, F Compennolle, and G Janssen. An improved synthesis of N-6-(6-aminohexyl)-FAD. *Nucleosid Nucleotid*, 14:689–692, 1995.
- [77] P Zappelli, R Pappa, A Rossodivita, and L Re. Carboxylic and polyethyleneimine-bound FAD derivatives. *Eur J Biochem*, 89:491–499, 1978.
- [78] D L Morris and R T Buckler. Colorimetric immunoassays using flavin adenine dinucleotide as label. *Methods Enzymol*, 92:413–425, 1983.
- [79] D L Morris, P B Ellis, R J Carrico, F M Yeager, H R Schroeder, J P Albarella, and R C Boguslaski. Flavin adenine dinucleotide as a label in homogeneous colorimetric immunoassays. *Anal Chem*, 53:658–665, 1981.
- [80] M Tuomola, S Lahdenperä, K Cooper, C Elliott, and T Tövgren. Dry chemistry immunoassay for zeranol using the all-in-one-well concept (poster). In *Agri-Food Antibodies '99*, Norwich, UK, 1999.

- [81] M C Lai and E M Topp. Solid-state chemical stability of proteins and peptides. *J Pharm Sci*, 88:489–500, 1999.
- [82] C Ó Fágáin. *Stabilizing Protein Function*. Springer, Berlin, 1997.
- [83] M I Esteves, W Quintilio, R A Sato, I Raw, P S de Araujo, and M H B da Costa. Stabilisation of immunoconjugates by trehalose. *Biotechnol Lett*, 22:417–420, 2000.
- [84] S Rossi, M P Buera, S Moreno, and J Chirife. Stabilization of the restriction enzyme EcoRI dried with trehalose and other selected glass-forming solutes. *Biotechnol Prog*, 13:609–616, 1997.
- [85] M Sola-Penna and J R Meyer-Fernandes. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: Why is trehalose more effective than other sugars? *Arch Biochem Biophys*, 360:10–14, 1998.
- [86] M P Buera, S Rossi, S Moreno, and J Chirife. DSC confirmation that vitrification is not necessary for stabilization of the restriction enzyme EcoRI dried with saccharides. *Biotechnol Prog*, 15:577–579, 1999.
- [87] A Lobnik, I Oehme, I Murkovic, and O S Wolfbeis. pH optical sensors based on sol-gels: Chemical doping versus covalent immobilization. *Anal Chim Acta*, 367:159–165, 1998.
- [88] O S Wolfbeis, I Oehme, N Papkovskaya, and I Klimant. Sol-gel based glucose biosensors employing optical oxygen transducers, and a method for compensating for variable oxygen background. *Biosens Bioelectron*, 15:69–76, 2000.
- [89] T Cass and F S Ligler. *Immobilized Biomolecules in Analysis*. A practical approach. Oxford University Press, Oxford, 1998.
- [90] G T Hermanson. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, San Diego, 1996.
- [91] T P Graycar. Protein engineering of subtilisin. In *Biocatalysts for Industry*, pages 257–283. Plenum Press, New York, 1991.
- [92] D Hansen. Eine neue Waschmittelprotease. *Henkel Referate*, 27:40–45, 1991.
- [93] A Coghlan. From a watery grave. *New Scientist*, 14 March 1998, [<http://www.newscientist.com/ns/980314/nwhale.html>].
- [94] J Suh and S S Hah. Organic artificial proteinase with active site comprising three salicylate residues. *J Am Chem Soc*, 120:10088–10093, 1998.
- [95] G Wulff, T Gross, R Schönfeld, T Schrader, and C Kirsten. Molecular imprinting for the preparation of enzyme-analogous polymers. In *Molecular and ionic recognition with imprinted polymers*, volume 703 of *ACS Symp. Ser.*, pages 10–28. American Chemical Society, Washington, 1998.

- [96] M J Soth and J S Nowick. Unnatural oligomers and unnatural oligomer libraries. *Curr Opin Chem Biol*, 1:120–129, 1997.
- [97] A Bückmann. Verfahren zur Herstellung von an Makromoleküle gebundenen, ein Adeninringsystem enthaltenden Koenzymen, Deutsches Patent, DE 28 41 414 B1, 22.9.78.
- [98] A Bückmann. Verfahren zur Herstellung von N⁶-substituiertem NAD, NADP, FAD, Europäisches Patent, EP 0 247 537, 24.5.86.
- [99] A F Bückmann and G Carrea. Synthesis and application of water-soluble macromolecular derivatives of the redox coenzymes NAD(H), NADP(H) and FAD. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, volume 39, pages 97–152. Springer, Berlin, 1989.
- [100] A Riklin, E Katz, I Willner, A Stocker, and A F Bückmann. Improving enzyme-electrode contacts by redox modification of cofactors. *Nature*, 376:672–675, 1995.
- [101] A Stocker, H-J Hecht, and A F Bückmann. Synthesis, characterization and preliminary crystallographic data of N⁶-(6-carbamoylhexyl)-FAD-D-amino-acid oxidase from pig kidney, a semisynthetic oxidase. *Eur J Biochem*, 238:519–528, 1996.
- [102] J Dec, K Haider, A Schaffer, E Fernandes, and J M Bollag. Use of a silylation procedure and ¹³C-NMR spectroscopy to characterize bound and sequestered residues of cyprodinil in soil. *Environ Sci Technol*, 31:2991–2997, 1997.
- [103] K Haider, M Spiteller, K Reichert, and M Fild. Derivatization of humic compounds: An analytical approach for bound organic residues. *Intern J Environ Anal Chem*, 46:201–211, 1992.
- [104] U Klaus, T Pfeifer, and M Spiteller. APCI-MS/MS: A powerful tool for the analysis of bound residues resulting from the interaction of pesticides with DOM and humic substances. *Environ Sci Technol*, 34:3514–3520, 2000.
- [105] G Henkelmann. Analytik “nicht extrahierbarer Anteile“ von Atrazin und seiner Abbauprodukte aus Bodenproben. In *Buch der Umweltanalytik*, volume 4, pages 105–107. GIT Verlag, 1992.
- [106] E Simon, M G Weller, and R Niessner. Characterization of a covalent triazine humic acid conjugate by gas chromatography. *Fresenius J Anal Chem*, 360:824–826, 1998.
- [107] F Lottspeich and H Zorbas. *Bioanalytik*. Spektrum Verlag, Heidelberg, 1998.
- [108] E Simon. *Entwicklung von Immunoassays für Sulfonylharnstoffe und huminsäuregebundene Triazinherbizide*. Dissertation, Technische Universität München, 1998.

- [109] T Giersch, G Sohn, and B Hock. Monoclonal antibody-based immunolocalization of bound triazine residues in two aquatic macrophytes (*Elodea canadensis* and *Myriophyllum spicatum*). *Anal Lett*, 26:1831–1845, 1993.
- [110] A Hahn, F Frimmel, A Haisch, G Henkelmann, and B Hock. Immunolabelling of atrazine residues in soil. *Z Pflanzenernähr Bodenk*, 155:203–208, 1992.
- [111] G Sohn, C Sautter, and B Hock. Fluorescence immunolocalization of bound atrazine residues in plant tissue. *Planta*, 181:199–203, 1990.
- [112] A Dankwardt and B Hock. Bestimmung gebundener Triazinrückstände im Boden mit immunchemischen Methoden. *GIT Fachz Lab*, 39:721–722, 1995.
- [113] P Ulrich, M G Weller, and R Niessner. Immunological determination of triazine pesticides bound to soil humic acids (bound residues). *Fresenius J Anal Chem*, 354:352–358, 1996.
- [114] P Pfortner. *Enzymimmunoassays (ELISAs) zur Bestimmung von huminstoffgebundenen Nitroaromaten*. Dissertation, Technische Universität München, 1998.
- [115] P Pfortner, M G Weller, and R Niessner. Detection of bound nitroaromatic residues in soil by immunoassay. *Fresenius J Anal Chem*, 360:781–783, 1998.
- [116] P Pfortner, M G Weller, and R Niessner. Immunological method for the detection of nitroaromatic residues covalently bound to humic acids. *Fresenius J Anal Chem*, 360:192–198, 1998.
- [117] M Dosch. *Huminsäure-gebundenes Pyren im Boden - Nachweis mit Sandwich-Immunoassays*. Diplomarbeit, Technische Universität München, 1995.
- [118] M Dosch, M G Weller, and R Niessner. Detection of bound residues in soils by sandwich-immunoassay. In *International Conference on Environmental Monitoring and Hazardous Waste Site Remediation*, volume 2504 of *Proceedings EurOpto Series*, pages 115–126, München, 1995. SPIE - The International Society for Optical Engineering.
- [119] A Dankwardt, B Hock, R Simon, D Freitag, and A Kettrup. Determination of non-extractable triazine residues by enzyme immunoassay: Investigation of model compounds and soil fulvic and humic acids. *Environ Sci Technol*, 30:3493–3500, 1996.
- [120] J B Jahnel and F H Frimmel. Enzymatic release of amino acids from different humic substances. *Acta hydrochim hydrobiol*, 23:31–35, 1995.
- [121] J B Jahnel and F H Frimmel. Detection of glucosamine in the acid hydrolysis solution of humic substances. *Fresenius J Anal Chem*, 354:886–888, 1996.

- [122] J Dec, K Haider, A Benesi, V Rangaswamy, A Schäffer, U Plücken, and J M Bollag. Analysis of soil-bound residues of ^{13}C -labeled fungicide cyprodinil by NMR spectroscopy. *Environ Sci Technol*, 31:1128–1135, 1997.
- [123] L L Jaeger, A D Jones, and B D Hammock. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for atrazine mercapturic acid in human urine. *Chem Res Toxicol*, 11:342–352, 1998.
- [124] G L Lamoureux, L E Stafford, R H Shimabukuro, and R G Zaylskie. Atrazine metabolism in sorghum: Catabolism of the glutathione conjugate of atrazine. *J Agric Food Chem*, 21:1020–1030, 1973.
- [125] L M Boscato, G Egan, and M C Stuart. Covert cross reactants in a two-site immunoassay studied with monoclonal antibodies. *Anal Biochem*, 146:393–401, 1985.
- [126] L M Boscato, G M Egan, and M C Stuart. Specificity of two-site immunoassays. *J Immunol Meth*, 117:221–229, 1989.
- [127] L M Boscato and M C Stuart. Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin Chem*, 32:1491–1495, 1986.
- [128] J D Beatty, B G Beatty, and W G Vlahos. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *J Immunol Meth*, 100:173–179, 1987.
- [129] A Philippi. *Abhängigkeit der Kreuzreaktionen vom Testformat in Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel verschiedener Nitroaromaten*. Diplomarbeit, Technische Universität München, 1998.
- [130] O Eikenberg. *Validierung immunochemischer Test-Kits zum Nachweis von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) in Boden*. Dissertation, Technische Universität München, 2000.
- [131] W D Linscott. *Linscott's directory of immunological and biological reagents*, volume 11. Linscott, W D, Santa Rosa, CA, USA, 2000.
- [132] A Abad, J J Manclus, F Mojarrad, J V Mercader, M A Miranda, J Primo, V Guardiola, and A Montoya. Hapten synthesis and production of monoclonal antibodies to DDT and related compounds. *J Agric Food Chem*, 45:3694–3702, 1997.
- [133] A Abad and A Montoya. Production of monoclonal antibodies for carbaryl from a hapten preserving the carbamate group. *J Agric Food Chem*, 42:1818–1823, 1994.
- [134] A Abad, M J Moreno, and A Montoya. Hapten synthesis and production of monoclonal antibodies to the N-methylcarbamate pesticide methiocarb. *J Agric Food Chem*, 46:2417–2426, 1998.
- [135] A Abad, M J Moreno, and A Montoya. Development of monoclonal antibody-eased immunoassays to the N-methylcarbamate pesticide carbofuran. *J Agric Food Chem*, 47:2475–2485, 1999.

- [136] A Abad, J Primo, and A Montoya. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to carbaryl. 1. Antibody production from several haptens and characterization in different immunoassay formats. *J Agric Food Chem*, 45:1486–1494, 1997.
- [137] Y W Chiu, R E Carlson, K L Marcus, and A E Karu. A monoclonal immunoassay for the coplanar polychlorinated biphenyls. *Anal Chem*, 67:3829–3839, 1995.
- [138] T Giersch and B Hock. Production of monoclonal antibodies for the determination of s-triazines with enzyme immunoassays. *Food Agric Immunol*, 2:85–97, 1990.
- [139] T Giersch and K Kramer. Production and application of monoclonal antibodies for the determination of pesticides. In *Immunological Detection of Pesticides and their Metabolites in the Water Cycle*, pages 25–42. VCH/DFG, Weinheim, 1995.
- [140] A E Karu, M H Goodrow, D J Schmidt, B D Hammock, and M W Bigelow. Synthesis of haptens and derivation of monoclonal antibodies for immunoassay of the phenylurea herbicide diuron. *J Agric Food Chem*, 42:301–309, 1994.
- [141] A E Karu, R O Harrison, D J Schmidt, C E Clarkson, J Grassmann, M H Goodrow, A Lucas, B D Hammock, J M Van Emon, and R J White. Monoclonal immunoassay of triazine herbicides. In *Immunoassays for Trace Chemical Analysis*, volume 451 of *ACS Symp. Series*, pages 59–77. American Chemical Society, 1991.
- [142] J J Manclús and A Montoya. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for 3,5,6-trichloro-2-pyridinol. 1. Production and characterization of monoclonal antibodies. *J Agric Food Chem*, 44:3703–3709, 1996.
- [143] J J Manclús, J Primo, and A Montoya. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide chlorpyrifos. 1. Monoclonal antibody production and immunoassay design. *J Agric Food Chem*, 44:4052–4062, 1996.
- [144] J V Mercader and A Montoya. Development of monoclonal ELISAs for azinphos-methyl. 1. Hapten synthesis and antibody production. *J Agric Food Chem*, 47:1276–1284, 1999.
- [145] J R Sanborn, S J Gee, S D Gilman, Y Sugawara, A D Jones, J Rogers, F Szurdoki, L H Stanker, D W Stoutamire, and B D Hammock. Hapten synthesis and antibody development for polychlorinated dibenzo-p-dioxin immunoassays. *J Agric Food Chem*, 46:2407–2416, 1998.
- [146] J-M Schlaeppli, W Föry, and K Ramsteiner. Hydroxyatrazine and atrazine determination in soil and water by enzyme-linked immunosorbent assay using specific monoclonal antibodies. *J Agric Food Chem*, 37:1532–1538, 1989.

- [147] J M Schlaeppli, W Föry, and K Ramsteiner. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for atrazine and hydroxyatrazine. In *Immunochemical Methods in Environmental Analysis*, volume 442 of *ACS Symposium Series*. American Chemical Society, Washington, DC, 1990.
- [148] M G Weller. Problems with the availability and quality of commercial antibodies for environmental applications (poster). In *Second Workshop on Biosensors and Bioanalytical Techniques in Environmental Analysis*, Lund, Schweden, 1996.
- [149] L Kass, J Varayoud, H Ortega, M M De Toro, and E H Luque. Detection of bromodeoxyuridine in formalin-fixed tissue. DNA denaturation following microwave or enzymatic digestion pretreatment is required. *Eur J Histochem*, 44:185–191, 2000.
- [150] M A Quijano, P Moreno, A M Gutiérrez, M C Pérez-Conde, and C Cámara. Selenium speciation in animal tissues after enzymatic digestion by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 35:878–884, 2000.
- [151] M G Weller, A Zeck, P Pfortner, E Simon, and R Niessner. Novel concepts for the immunological detection of bound residues. *Intern J Environ Anal Chem*, 75:201–215, 1999.
- [152] R Ekins. Principles of non-competitive methods. In *Fundamentals*, volume 1 of *Methods of Immunological Analysis*, pages 227–257. VCH, Weinheim, 1993.
- [153] K Haider, M Spiteller, A Wais, and M Fild. Evaluation of the binding mechanism of anilazine and its metabolites in soil organic matter. *Intern J Environ Anal Chem*, 53:125–137, 1993.
- [154] M G Weller. Immunochromatographic techniques - a critical review. *Fresenius J Anal Chem*, 366:635–645, 2000.
- [155] P Ulrich, M G Weller, D Knopp, and R Niessner. Enzyme-linked immunosorbent assay for humic acids. *Anal Sci*, 9:795–797, 1993.
- [156] M G Weller. *Chemische und physikalische Einflüsse auf die Triazinbestimmung im Wasser mittels Enzymimmunoassay*. Diplomarbeit, Technische Universität München, 1989.
- [157] G Giraudi, I Rosso, C Baggiani, and C Giovannoli. Affinity between immobilised monoclonal and polyclonal antibodies and steroid-enzyme tracers increases sharply at high surface density. *Anal Chim Acta*, 381:133–146, 1999.
- [158] A J Schütz, M Winklmaier, M G Weller, and R Niessner. Stabilization of horseradish peroxidase (HRP) for the use in immunochemical sensors. *SPIE Proc.*, 3105:332–340, 1997.
- [159] M Schäfer. *Immunochemische Bestimmung gebundener Pflanzenschutzmittelrückstände am Beispiel des Fungizids Kresoxim-methyl*. Dissertation, Universität Hohenheim, 1998.

- [160] C Achtnich, P Pfortner, M G Weller, R Niessner, H Lenke, and H J Knackmuss. Reductive transformation of bound trinitrophenyl residues and free TNT during a bioremediation process analyzed by immunoassay. *Environ Sci Technol*, 33:3421–3426, 1999.

Kapitel 7

Abkürzungen/Glossar

Abkürzung	Bedeutung (engl.)	Bedeutung/Erklärung (dtsh.)
AICREIA	Antibody induced conformational restriction enzyme immunoassay	Homogener Immunoassay-Typ
ARIS	Apoenzyme reactivation immunoassay system	Homogener Immunoassay-Typ
CCD	Charge-coupled device	Detektor in Video- und Digitalkameras
CEDIA	Cloned enzyme donor immunoassay	Homogener Immunoassay-Typ
CLIA	Cofactor labeled immunoassay	Homogener Immunoassay-Typ
CMOS imaging sensor	Complementary metal oxide semiconductor	Halbleiterdetektor (ähnlich CCD)
CR	Cross reactivity	Kreuzreaktion
ECIA	Enzyme channeling immunoassay	Homogener Immunoassay-Typ
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Enzymimmunoassay (heterogen)
EMIT	Enzyme multiplied immunoassay technique	Homogener Immunoassay-Typ
EMMIA	Enzyme modulator mediated immunoassay	Homogener Immunoassay-Typ
Fab	Antigen binding fragment	Antigenbindendes Fragment eines Antikörpers
Fc	Crystallizable fragment	Kristallisierbares Fragment eines Antikörpers
FRET	Fluorescence resonance energy transfer	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GR	Bound residues	Gebundene Rückstände
HPLC	High-performance liquid chromatography	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRP	Horseradish peroxidase	Meerrettichperoxidase
HTS	High throughput screening	Hochdurchsatz-Durchmusterung
KLH	Keyhole limpet hemocyanin	Schlüssellochschnellen-Hämocyanin (Protein)
LIA	Liposome immunoassay	Homogener Immunoassay-Typ
MAb	Monoclonal Antibody	Monoklonaler Antikörper
MIP	Molecularly imprinted polymer	Templat-Polymer
MPP	Multi-pinned phase	Reduziert den Dunkelstrom bei CCDs
μ -TAS	Miniaturized total (chemical) analysis system	Miniaturisiertes Totalanalysensystem
MTP	Microtitration plate	Mikrotiterplatte (meist mit 96 Kavitäten)
NHS	N-Hydroxysuccinimide	N-Hydroxysuccinimid
NSB	Non-specific binding	Unspezifische Bindung
PASA	Parallel affinity sensor array	Parallele Affinitätssensor-Array
POD	Peroxidase	Meist im Sinne von Meerrettichperoxidase
PNA	Peptide nucleic acid	Peptid-Nucleinsäure
RIA	Radioimmunoassay	Immunoassay mit radioaktiver Markierung
SLFIA	Substrate labeled fluorescence immunoassay	Homogener Immunoassay-Typ
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
UHTS	Ultra-high throughput screening	Ultrahochdurchsatz-Durchmusterung

Kapitel 8

Danksagungen

Meinem Lehrer Prof. Dr. R. Nießner danke ich für die langjährige Unterstützung und kritische Begleitung aller Arbeiten.

Meinen (teilweise ehemaligen) Mitarbeitern Dr. M. Mayr, Dr. A. J. Schütz, Dr. M. Winklmaier, Dr. P. Pfortner, Dr. E. Simon, A. Zeck, M. Diemer, C. Werschling, B. Fall, I. Schaupt und A. Eikenberg bin ich für ihren unermüdlichen Einsatz und ihre hervorragende Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Meinem ehemaligen Betreuer Dr. L. Weil danke ich für die Einführung in das interessante Gebiet der Immunoassays.

Dr. M. Fránek, Veterinary Research Institute, Brno, Tschechien, danke ich für die freundliche Überlassung des 2,4-D-Antikörpers E4/C2.

Der Firma Strategic Diagnostics, Inc. (SDI), USA, bin ich für die freundliche Überlassung des TNT-Antikörpers A/1.1.1 zu Dank verpflichtet.

Dr. A. E. Karu, Hybridoma Facility, U.C. Berkeley College of Natural Resources, Albany, USA, danke ich für die freundliche Überlassung von Triazin- und PCB-Antikörpern.

Dr. S. Nagata, Laboratory of Molecular Biology, National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda, USA, danke ich für die freundliche Überlassung des Microcystin-Antikörpers M8H5.

Dr. A. F. Bückmann, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF), Braunschweig, danke ich für die Überlassung von FAD-Derivaten.

Dr. C. Achtnich, Dr. H. Lencke und Prof. Dr. H.-J. Knackmuss, Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart, danke ich für die fruchtbare Kooperation.

Dr. A. Haisch und Herrn G. Henkelmann, Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau (LBP), München, danke ich für die Kooperation im Bereich "Gebundene Rückstände".

Dr. J. Morrall, Dr. D. Steffensen, Dr. B. Nicholson und Prof. Dr. D. Bursill, Australian Water Quality Centre (AWQC), Adelaide, Australien, danke ich für die kontinuierliche Kooperation auf dem Gebiet der cyanobakteriellen Toxine.

Dr. H. Tao und Dr. R. Naganawa, National Institute for Resources and Environment (NIRE), MITI, Japan danke ich für die hilfreiche Kooperation im Biosensor-Bereich.

Dem Zentralbereich Analytik (Fakultät Chemie und Pharmazie) der Ludwig-Maximilians-Universität München und Prof. Dr. M. Pischetsrieder, Universität Erlangen, bin ich für zahlreiche NMR-Messungen zu großem Dank verpflichtet.

Dr. U. Panne, Dr. R. J. Schneider, Dr. P. Gahr, Dr. U. Pöschl, M. Schedl, T. Scharnweber und PD Dr. D. Knopp sei für die zahllosen Anregungen und die freundschaftliche Unterstützung gedankt.

Zudem danke ich allen Geldgebern, die die hier vorgestellten und weitere Projekte ermöglicht haben:

Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten
Bundesamt für Wehrtechnik und Beschaffung (BWB)
Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)
Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)
Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V.
Hoechst Schering AgrEvo GmbH, Frankfurt/Main
Merck KGaA, Darmstadt
r-biopharm, Darmstadt
Technische Universität München (TUM)

Herzlichen Dank meinen Eltern und meinem Bruder, die mich auch in schwierigen Zeiten immer ermutigt haben.

Auch allen nicht namentlich Genannten, die mich bei meinen Projekten mit Rat und Tat unterstützt haben, möchte ich meinen Dank aussprechen.

Kapitel 9

Publikationsverzeichnis

*Biochip/PASA*¹

- **M G Weller***, A J Schuetz, M Winklmaier, R Niessner: Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water, *Anal Chim Acta* 393 (1999) 29-44.
- A J Schuetz, M Winklmaier, **M G Weller***, R Niessner: Selection of hapten structures for indirect immunosensor arrays, *Fresenius J Anal Chem* 363 (1999) 625-631.
- M Winklmaier, A J Schuetz, **M G Weller***, R Niessner: Immunochemical array for the identification of cross-reacting analytes, *Fresenius J Anal Chem* 363 (1999) 731-737.
- M Winklmaier, A J Schuetz, **M G Weller**, R Niessner: New regeneration method for competitive immunosensors, *Bioluminescence and Chemiluminescence – Perspectives for the 21th Century*, Proc. 10th Intern. Symp. 1998, Bologna, Eds. A Roda, M Pazzagli, L J Kricka, P E Stanley, pp. 134-137, John Wiley & Sons, Chichester, 1999.

Teststreifen/ARIS

- M Dosch, **M G Weller**, A F Bückmann, R Niessner*: Homogeneous immunoassay for the detection of trinitrotoluene (TNT) based on reactivation of apoglucose oxidase using a novel FAD-TNT conjugate, *Fresenius J Anal Chem* 361 (1998) 174-178.
- C Heiss, **M G Weller***, R Niessner: Dip-and-read test strips for the determination of trinitrotoluene (TNT) in drinking water, *Anal Chim Acta* 396 (1999) 321-328.

¹• Artikel im Anhang, * Korrespondenzautor

Gebundene Rückstände

- P Ulrich, **M G Weller**, R Niessner*: Immunological determination of triazine pesticides bound to soil humic acids (bound residues), *Fresenius J Anal Chem* 354 (1995) 352-358.
 - P Pfortner, **M G Weller***, R Niessner: Immunological method for the detection of nitroaromatic residues covalently bound to humic acids, *Fresenius J Anal Chem* 360 (1998) 192-198.
 - P Pfortner, **M G Weller***, R Niessner: Detection of bound nitroaromatic residues in soil by immunoassay, *Fresenius J Anal Chem* 360 (1998) 781-783.
 - E Simon, **M G Weller***, R Niessner: Characterization of a covalent triazine-humic acid conjugate by gas chromatography, *Fresenius J Anal Chem* 360 (1998) 824-826.
 - C Achtnich, P Pfortner, **M G Weller**, R Niessner, H Lenke*, H-J Knackmuss: Reductive transformation of bound trinitrophenyl residues and free TNT during a bioremediation process analyzed by immunoassay, *Environ Sci Technol* 33 (1999) 3421-3426.
- M G Weller***, A Zeck, P Pfortner, E Simon, R Niessner: Novel concepts for the immunological detection of bound residues, *Intern J Environ Anal Chem.* 75 (1999) 201-215.
- P Ulrich, **M G Weller**, D Knopp, R Niessner*: Enzyme-linked immunosorbent assay for humic acids, *Anal Sci* 9 (1993) 795-797.
- M Dosch, **M G Weller**, R Niessner*: Detection of bound residues in soils by sandwich-immunoassay, *SPIE Proc* 2504 (1995) 115-126.

Sonstige

- **M G Weller***: Immunochromatographic techniques – a critical review, *Fresenius J Anal Chem* 366 (2000) 6/7, 635-645.
- A P Abel, **M G Weller**, G L Duveneck, M Ehrat*, H M Widmer: Fiber-optic evanescent wave biosensor for the detection of oligonucleotides, *Anal Chem* 68 (1996) 2905-2912.
- M Winklmaier, **M G Weller**, J Mangler, B Schlosshauer, R Niessner*: Development of a highly sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides, *Fresenius J Anal Chem* 358 (1997) 614-622.
- A J Schuetz, **M G Weller***, R Niessner: A novel method for the determination of a PCB sum value by enzyme immunoassay to overcome the cross-reactivity problem, *Fresenius J Anal Chem* 363 (1999) 777-782.

• A Zeck, **M G Weller***, R Niessner: Characterization of a monoclonal TNT-antibody by measurement of the cross-reactivities of nitroaromatic compounds, *Fresenius J Anal Chem* 364 (1999) 113-120.

A J Schütz*, M Winklmaier, **M G Weller**, R Niessner: Stabilization of horseradish peroxidase (HRP) for the use in immunochemical sensors, *SPIE Proc* 3105 (1997) 332-340.

M Winklmaier, A J Schuetz, **M G Weller***, R Niessner: Stabilization of antibodies by haptens, *Fresenius J Anal Chem* 363 (1999) 619-624.

T Giersch, K Kramer, **M G Weller**, B Hock*: Improvement of a monoclonal antibody-based immunoassay for the determination of terbutryn, *Acta hydrochim hydrobiol* 21 (1993) 312-315.

J Mangler, **M G Weller**, L Weil, R Niessner*, H. Hämmerle, B. Schloßhauer: New monoclonal antibodies to triazine herbicides, *Fresenius J Anal Chem* 349 (1994) 346-348.

G Stangl, **M G Weller**, R Niessner*: Increased sensitivity and selectivity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of atrazine by use of non-ionic surfactants, *Fresenius J Anal Chem* 351 (1995) 301-304.

L Weil, R Niessner, R J Schneider, T Ruppert, **M G Weller**: Validation of immunoassay for determination of triazine herbicides, In: *Immunochemical detection of pesticides and their metabolites in the water cycle*, Eds. B. Hock, R. Niessner, VCH, Weinheim (1995) 43-62.

M G Weller*, R Niessner: Affinity patterns of enzyme tracers for triazine immunoassays, *SPIE Proc* 3105 (1997) 341-352.

Patente und Patentanmeldungen

M G Weller, A J Schütz, M Winklmaier, R Niessner: Verfahren und Vorrichtung zur parallelen Messung von mehreren Analyten in komplexen Mischungen, *Deutsche Offenlegungsschrift* Nr. 197 36 641, 22. August 1997

M G Weller: Kovalente Polymerbeschichtung von Oberflächen, *Deutsches Patent* Nr. DE 197 43 938, 4. Oktober 1997

M G Weller, M Winklmaier, A J Schütz, R Niessner: Verfahren zur Beschleunigung der Dissoziation von Komplexen, *Deutsches Patent* Nr. DE 198 08 003, 27. Februar 1998

