

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Analytische Chemie
Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

Sensitiver und paralleler Nachweis von Biotoxinen mittels Chemilumineszenz-Durchfluss-Mikroarrays

Agathe Szkola

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. A. Itzen
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner
2. Univ.-Prof. Dr. E.P. Märtlbauer,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 12.11.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 31.12.2013 angenommen.

Mit dem Wissen wächst der Zweifel

J. W. v. Goethe

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von November 2009 bis Oktober 2012 am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. R. Nießner angefertigt.

Herrn Prof. Dr. R. Nießner möchte ich besonders für die interessante und vielseitige Aufgabenstellung, die freundliche Aufnahme in sein Institut und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. M. Seidel für die Betreuung und fachliche Unterstützung meiner Arbeit. Neben dem eigenverantwortlichen Arbeiten und Einbringen von eigenen Ideen, waren seine wertvollen Anregungen und stete Diskussionsbereitschaft immer sehr hilfreich.

Besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. K. Campbell für die Bereitstellung der marinen Biotoxine Domoinsäure, Okadasäure und Saxitoxin bedanken. Zudem erhielt ich verschiedene Antikörper gegen die marinen Biotoxine, zahlreiche Derivate von Saxitoxin sowie unbelastete und kontaminierte Muschelproben. Ein weiteres Dankeschön gilt Frau Dr. B. Dorner für die Bereitstellung der hochmolekularen Biotoxine Rizin und SEB und deren Antikörper. Beiden Projektpartnern danke ich für ihre Offenheit und ihre wertvollen Anregungen, die für meine eigene Forschung sehr hilfreich waren. Auch möchte ich bei Herrn Prof. E. Märklbauer für die Bereitstellung des anti-idiotypischen Antikörpers gegen Saxitoxin bedanken.

Bei meinen Kollegen Sandra Lengger, Dr. Veronika Langer und Dr. Sonja Ott möchte ich mich für ihre stete Hilfsbereitschaft, ihre Unterstützung sowie auch für die gemeinsamen Freizeitaktivitäten bedanken. Klaus Wutz danke ich für die vielen fruchtbaren Diskussionen über Mikroarrays und die damit verbundenen Themengebiete. Mein Dank gilt auch allen Kollegen Lu Pei, Dr. Martin Rieger, Dr. Gerhard Pappert, Simon Donhauser, Maria Hübner und Georg Hartmann der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. M. Seidel sowie allen meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut, die hier namentlich nicht erwähnt wurden. Vielen Dank auch an Sandra Lengger, Dr. Veronika Langer, Dr. Sonja Ott und Maria Hübner für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, meinen Freunden und meinem langjährigen Lebenspartner für die Unterstützung während meines ganzen Studiums bedanken.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht:

Szkola, A., Campbell, K., Elliot, C.T., Niessner, R., Seidel, M., *Automated, high performance, flow-through chemiluminescence microarray for multiplexed detection of phycotoxins*, *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 787, 211-218.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielstellung	1
2	Theorie.....	7
2.1	Biotoxine	7
2.1.1	Phycotoxine	7
2.1.1.1	Domoinsäure.....	9
2.1.1.2	Okadasäure	11
2.1.1.3	Saxitoxin.....	13
2.1.2	Proteotoxine	16
2.1.2.1	Rizin	16
2.1.2.2	Staphylococcus Enterotoxin B (SEB).....	22
2.2	Antikörper	26
2.2.1	Eigenschaften	26
2.2.2	Struktur und Aufbau	26
2.2.3	Monoklonale und polyklonale Antikörper	28
2.2.4	Anti-idiotypische Antikörper	30
2.3	Analytik von Phycotoxinen	32
2.3.1	Mausbioassay als biologisches Nachweisverfahren.....	32
2.3.2	Analytische Methoden.....	33
2.3.3	Funktionelle Assays	36
2.3.3.1	Zell-basierte Assays.....	36
2.3.3.2	Ligand/Rezeptor-Bindungsassays	37
2.3.4	Immunologische Verfahren.....	38
2.3.4.1	Einzelnachweisverfahren.....	41
2.3.4.2	Multiplexnachweisfahren	47
2.3.4.3	Mikroarray-Technologie.....	48
2.3.5	Validierung analytischer Methoden	50
2.4	Analytik von hochmolekularen Proteotoxinen	51
2.4.1	Analytische Methoden.....	51
2.4.2	Immunologische Verfahren	52
2.4.2.1	Einzelnachweisverfahren.....	53
2.4.2.2	Multiplexnachweisfahren	53
3	Ergebnisse und Diskussion	59
3.1	Phycotoxine	59
3.1.1	Assay-Prinzip	59

3.1.2	Optimierung der Immobilisierungs-Bedingungen für Phycotoxine.....	60
3.1.3	Bestimmung der Varianzen eines Phycotoxin-Mikroarrays	62
3.1.4	Bestimmung der Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper	63
3.1.4.1	Bestimmung der Antikörper-Spezifität	63
3.1.4.2	Kreuzreaktivität von anti-STX zu STX-Analoga	65
3.1.5	Optimierung des Messprogramms	68
3.1.5.1	Flussrate der Primärantikörper	68
3.1.5.2	Flussrate der Sekundärantikörper	69
3.1.5.3	Konzentration der Primärantikörper	70
3.1.5.4	Zusammenfassung	72
3.1.6	Untersuchung der Regenerierbarkeit.....	72
3.1.7	Regenerations- und Immobilisierungsstrategien für Saxitoxin.....	74
3.1.7.1	Regenerationspuffer	74
3.1.7.2	Modifizierung der Glasoberflächen.....	75
3.1.7.3	Kovalente Kopplungsmethoden für STX	77
3.1.7.4	Zusammenfassung	79
3.1.8	Messstrategie	80
3.1.9	Einzel- und Multiplex-Kalibrierung.....	81
3.1.10	Wiederfindung.....	85
3.1.10.1	Korrekturmethode.....	85
3.1.10.2	Anwendbarkeit der Korrekturmethode.....	91
3.1.11	Messung von Muschelproben.....	93
3.1.11.1	Probenvorbereitung	93
3.1.11.2	Auswahl des Extraktionspuffers & Bestimmung der Extraktionsfaktoren.....	94
3.1.11.3	Kalibrierung.....	96
3.1.11.4	Wiederfindung.....	97
3.2	Proteotoxine	101
3.2.1	Assay-Prinzip	101
3.2.2	Problemstellung.....	102
3.2.3	Realisierung einer Signalamplifikation im stationären System	103
3.2.3.1	Erhöhung der Sensitivität des Assays durch das Konjugat SA-PolyHRP40	103
3.2.3.2	Verkürzung der Assayzeiten.....	105
3.2.3.3	Unterschied zwischen Agglutinin und Rizin bezüglich der Assay-Sensitivität ...	107
3.2.3.4	Auswahl geeigneter Antikörper-Paare.....	108
3.2.4	Übertragung der Ergebnisse auf ein Durchfluss-System	110
3.2.4.1	Vergleich kontinuierliche Zugabe und Stopped-Flow-Zugabe	111
3.2.4.2	Entwicklung eines Messprogramms	112
3.2.4.3	Optimierung des Messprogramms.....	115
3.2.5	Anwendung der optimierten Bedingungen.....	118
3.2.5.1	Reproduzierbarkeit der Messungen	118
3.2.5.2	Kalibrierung von Rizin	119

3.2.6	Kalibrierung von Staphylococcus Enterotoxin B (SEB).....	121
3.2.7	Kalibrierung von Saxitoxin	122
3.2.8	Multiplexmessungen von Rizin, Staphylococcus Enterotoxin B und Saxitoxin.....	124
3.2.8.1	Kombination verschiedener Assay-Prinzipien	124
3.2.8.2	Untersuchung der Reproduzierbarkeit von Multiplex-Messungen.....	126
3.2.8.3	Multiplex-Kalibrierungen.....	127
3.2.8.4	Wiederfindung.....	130
4	Zusammenfassung und Ausblick	132
5	Summary and Outlook.....	138
6	Experimentaltteil	143
6.1	Verwendete Materialien.....	143
6.1.1	Geräte und Zubehör.....	143
6.1.2	Software	144
6.1.3	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	144
6.1.4	Antigene, Antikörper, Enzyme, Konjugate und Toxine.....	147
6.2	Pufferlösungen	149
6.3	Herstellung von Antigen- und Antikörpermikroarrays.....	150
6.3.1	Beschichtung der Glasobjektträger	151
6.3.1.1	Herstellung von Polyethylenglykol-Oberflächen	151
6.3.1.2	Herstellung von Poly-L-Lysin-Oberflächen.....	152
6.3.1.3	Herstellung von Dendrimer-Oberflächen	152
6.3.1.4	Herstellung der Aminodextran-Oberflächen	153
6.3.2	Aktivierung.....	153
6.3.2.1	DiepoxyPEG-Aktivierung für Antigen-Mikroarrays.....	153
6.3.2.2	NHS-Aktivierung für Antikörper-Mikroarrays.....	153
6.3.3	Immobilisierung	154
6.3.3.1	Kontaktspotter	154
6.3.3.2	Antigene - Phycotoxine	154
6.3.3.3	Antikörper.....	155
6.3.4	Blocken.....	156
6.3.5	Fertigung der Mikroarray-Durchflusszellen.....	156
6.4	Messungen am Munich Chip Reader (MCR3)	157
6.4.1	Aufbau des MCR3.....	157
6.4.2	Messprogramme	159
6.4.2.1	Messprogramm für Antigen-Mikroarrays	159
6.4.2.2	Messprogramm für Antikörper-Mikroarrays.....	160
6.4.3	Auswertung	162

6.4.3.1	Erstellung und Auswertung der Kalibrierungen für Antigen- und Antikörper-Mikroarrays	162
6.4.3.2	Normierung der Signalintensität für Antigen- und Antikörper-Mikroarrays	164
6.4.3.3	Regeneration für Antigen-Mikroarrays	164
6.4.3.4	Korrektur der Wiederfindungsraten für Antigen-Mikroarrays	165
6.5	ELISA	166
6.5.1	Puffer	166
6.5.2	Durchführung	167
7	Abkürzungsverzeichnis.....	169
8	Literatur	171

1 Einleitung und Zielstellung

Toxische Substanzen von Mikroorganismen, Pilzen, Pflanzen oder Tieren bezeichnet man als Biotoxine [1]. Diese werden anhand ihrer Eigenschaft, eine schädigende Wirkung auf andere Organismen ausüben zu können, zu einer Gruppe zusammengefasst [2]. So findet man unter dem Begriff Biotoxine eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen, angefangen von niedermolekularen Toxinen mit 0,14 kDa, über Peptid- bis hin zu Proteintoxinen mit einem Molekulargewicht von 150 kDa. Die Toxizität ist jeweils stark unterschiedlich und hängt zum einen von der Dosis und dem speziellen Wirkmechanismus jedes einzelnen Biotoxins ab, zum anderen von der Inkorporation, die oral, inhalativ, dermal oder intravenös erfolgen kann.

Dosis sola fecit venenum - Allein die Dosis macht ein Gift (Paracelsus, 1493 - 1541)

Die Toxizität einer Substanz wird durch die letale Dosis (LD₅₀) angegeben. Definitionsgemäß sterben dabei 50% der Versuchstiere nach Aufnahme der Substanz in einem bestimmten Zeitraum [3]. In der nachfolgenden Tabelle 1.1 sind verschiedene Toxine in absteigender Reihenfolge ihrer Toxizität dargestellt. Die Toxizität wurde in Tierversuchen mit Mäusen ermittelt.

Tabelle 1.1: Vergleich der Toxizität von Biotoxinen und synthetischen Substanzen in Versuchen mit Mäusen [4].

Toxin	Toxizität LD ₅₀ [µg/kg]	Molekulargewicht [kDa]	Produzierender Organismus
Botulinumtoxin	0,001	150	Bakterium
Shigatoxin	0,002	55	Bakterium
Tetanustoxin	0,002	150	Bakterium
Abrin	0,04	65	Pflanze
Diphtherietoxin	0,1	62	Bakterium
Maitotoxin	0,15	3,4	Algen
Palytoxin	0,15	2,7	Weichkoralle
Ciguatoxin	0,4	1	Algen
Textilotoxin	0,6	80	Schlange
Perfringenstoxine	0,1 – 0,5	35 – 40	Bakterium
Batrachotoxin	2,0	0,5	Pfeilgiftfrösche
Rizin	3,0	64	Pflanze
α-Conotoxin	5,0	1,5	Kegelschnecken
Taipoxin	5,0	46	Schlange
Tetrodotoxin	8,0	0,3	Pufferfische

α -Tityustoxin	9,0	8	Skorpion
Saxitoxin	10,0	0,3	Algen
VX	15,0	0,3	Synthetische Substanz
Staphylococcus Enterotoxin B	27,0	28	Bakterium
Anatoxin-A	50,0	0,5	Cyanobakterien
Microcystine	50,0	1	Cyanobakterien
Soman	64,0	0,2	Synthetische Substanz
Sarin	100,0	0,1	Synthetische Substanz
Aconitin	100,0	0,6	Pflanze
T-2 Toxin	1210,0	0,5	Schimmelpilz

Die giftigsten Substanzen sind die Botulinumtoxine, die von dem grampositiven, anaeroben und sporenbildenden Bakterium *Clostridium botulinum* produziert werden. Mithilfe von Tierexperimenten konnte ermittelt werden, dass theoretisch 1 g Botulinumtoxin ausreichen würde, um den Tod von mehr als 10 Millionen Menschen herbeizuführen [2]. Verglichen mit den Biotoxinen sind synthetisch hergestellte Toxine weitaus weniger toxisch wie zum Beispiel Sarin, ein synthetisch hergestellter Nervenkampfstoff, der 100.000-mal weniger toxisch ist als die Botulinumtoxine. Einen großen Anteil zur hohen Toxizität der Biotoxine trägt die Evolution bei. Um als Folge auf die Veränderungen des Abwehrsystems der Zielorganismen zu reagieren, entwickelten sich Mutationen und weitere effektive Anpassung der Biotoxine auf die veränderten Bedingungen, wodurch letztendlich hochtoxische Substanzen mit einem hochspezifischen und komplexen Wirkungsmechanismus entstanden sind [2].

Die in der Natur vorkommenden Biotoxine werden mit dem Ziel der Verteidigung gegen Fraßfeinde oder dem Beutefang produziert. Folglich kann es zu natürlich bedingten Kontaminationen von Lebensmitteln durch Biotoxine kommen. Lebensmittelvergiftungen mit Botulinumtoxinen sind aufgrund von verbesserten Sterilisierungstechniken in Deutschland sehr selten geworden, enden jedoch oft tödlich für den Menschen. Im Durchschnitt gibt es jährlich ca. 30 Fälle von Botulismus-Erkrankung [5]. Die meisten davon beruhen auf dem Verzehr von selbstgemachten, unzureichend konservierten Fleisch- und Fischkonserven. Im Vergleich dazu ist die akute Toxizität des ubiquitär vorkommenden Biotoxins Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) mäßig. Beim Menschen kann bereits die Aufnahme einer geringen Menge von 20 – 25 μ g SEB ausgeprägte Vergiftungssymptome mit Krämpfen und Erbrechen hervorrufen, wobei Todesfälle sehr selten sind [6]. Die Hauptursache dieser Vergiftungen liegt in Lebensmitteln, die durch den Menschen selbst kontaminiert wurden. Bei nicht

ordnungsgemäßer Kühlung eiweißreicher Nahrungsmittel kann sich der Erreger *Staphylococcus aureus* schnell auf Speiseeis, Milchprodukten und Fleisch vermehren und Biotoxine bilden [7]. Ein weiteres Gefährdungspotenzial geht von kontaminierten Muscheln aus. Speisemuscheln können je nach Jahreszeit, lokaler Verteilung und durch äußere umweltbedingte oder anthropogene Einflüsse Phycotoxine enthalten [8]. Die bekanntesten Vertreter der marinen Biotoxine sind Domoinsäure (DA), Okadasäure (OA) und Saxitoxin (STX). Der Verzehr kontaminierter Muscheln löst beim Menschen verschiedene Vergiftungssymptome aus, die im Falle einer Saxitoxin-Vergiftung zu einer tödlichen Atemlähmung führen können [9].

Neben den natürlich bedingten Lebensmittel-Vergiftungen durch Biotoxine, rückt eine Gefährdung durch die Verwendung einiger Biotoxine als biologische Kampfstoffe in den öffentlichen Fokus. Der Begriff biologischer Kampfstoff umfasst neben den Toxinen biologischen Ursprungs eine Reihe pathogener und umweltresistenter Stämme von Bakterien und Viren. Das Centers for Disease Control and Prevention (CDC) hat Agenzien, die als biologische Kampfstoffe in Frage kommen in 3 Kategorien A (hoch), B (mittel) und C (gering) eingeteilt [10]. Die Klassifikation berücksichtigt dabei das Gefahrenpotential sowie die potentielle Einsetzbarkeit für einen bioterroristischen Anschlag. Die größte Bedrohung geht dabei von den in Kategorie A klassifizierten Agenzien wie Anthrax, Pest, Pockenerregern und den Botulinumtoxinen aus [11].

Nach Angaben des Labor Spiez [12] gilt der Einsatz von Bakterien als biologische Waffe wahrscheinlicher als der von Viren oder Toxinen, da Bakterien einfach zu züchten sind. Viren hingegen überleben schwer außerhalb ihres Wirtes. Toxine sind nicht ansteckend, so dass keine Übertragung zwischen den Menschen stattfindet. Der Umgang mit hoch infektiösen Bakterien birgt einige schwerwiegende Gefahren, was beispielsweise die ungewollte Freisetzung von Milzbrandsporen im Jahre 1979 im Rahmen der sowjetischen B-Waffenforschung zeigte. Bei diesem Unfall kamen damals mindestens 66 Menschen ums Leben [13].

Ein Vorteil von Biotoxinen verglichen zu bakteriellen Erregern liegt darin, dass Infektionen der eigenen Bevölkerung ausgeschlossen werden können. Für die „Eignung“ in einem militärischen Einsatz spielt neben der Toxizität auch die Verfügbarkeit und Stabilität eines Toxins eine wichtige Rolle. Mit dem Voranschreiten der Biotechnologie und Gentechnik sind neue Möglichkeiten entstanden, Biotoxine auch in hohen Mengen herzustellen [2]. Dennoch spielt die Verwendung von Biotoxinen als Massenvernichtungswaffen eine untergeordnete

Rolle. Im Irak wurde an den Biotoxinen Rizin, Botulinumtoxinen und Aflatoxinen als Massenvernichtungswaffe geforscht [14]. Die entwickelten Raketen, Bomben und Sprühkörper kamen jedoch nie zum Einsatz.

Obwohl die Verwendung von Biotoxinen als Massenvernichtungswaffe unwahrscheinlich ist, sollte man die von ihnen ausgehende Gefahr nicht unterschätzen. Bei den Biotoxinen besteht vielmehr das Risiko diese zielgerichtet im kleinen Maßstab bei Anschlägen oder Terrorakten einzusetzen. Eine wirksame Verbreitung der Biotoxine kann dabei über Aerosole, Lebensmittel oder Trinkwasser erfolgen [12]. Über Belüftungssysteme von großen Gebäuden könnten gezielt Aerosole eingebracht werden. Neben den Aerosolen stellen Lebensmittel ein weiteres Gefährdungspotenzial dar, da diese meist an zentralen Stellen produziert und verbreitet werden. Eine vorsätzliche Kontamination könnte dabei weitreichende Folgen haben. In einer Studie haben Wein und Liu [15] ein mathematisches Modell veröffentlicht, das theoretisch die verheerenden Folgen einer absichtlichen Freisetzung von 1 g Botulinumtoxin in die milchverarbeitende Industrie zeigt. Ohne jegliche Kontrollen würden 100.000 Menschen die kontaminierte Milch konsumieren. Einen weiteren relevanten Angriffspunkt bietet die Trinkwasserversorgung. Da eine flächendeckende Überwachung der Trinkwasserversorgung nicht möglich ist, könnten erforderliche Mengen an Toxinen unbemerkt und ohne große Probleme durch Terroristen in das System eingebracht werden. Um im Falle eines Anschlags präventive Maßnahmen zum Schutz der Bevölkerung einleiten zu können sind schnelle, automatisierte und multianalytfähige Systeme für Routinekontrollen an zentralen Stellen der Trinkwasserversorgung und Lebensmittelindustrie nötig.

Die dargestellten Rahmenbedingungen verdeutlichen, dass die gestellten Anforderungen an ein Detektionssystem für Biotoxine enorm hoch sind. Ein Problem dabei ist, dass zu der Gruppe der Biotoxine sehr viele verschiedene Substanzen mit einer großen Verteilung des Molekulargewichtes und unterschiedlichen funktionellen Gruppen gezählt werden. Natürlich bedingte Kontaminationen mit Biotoxinen kommen zudem in unterschiedlichen Lebensmitteln vor, wodurch verschiedene Matrixeffekte zu bewältigen sind. Weiterhin gilt der Missbrauch als biologische Waffe von einer Vielzahl von Toxinen im Falle eines bioterroristischen Anschlags als mögliches Szenarium, so dass ein Detektionssystem nötig ist, welches in kürzester Zeit ein möglichst breites Spektrum erdenklicher Kontaminanten abdeckt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Multiplex-Detektionssystem, Munich Chip Reader (MCR3) für Biotoxine entwickelt, welches die gestellten Anforderungen wie hohe

Sensitivität, Spezifität, Robustheit und Multianalytfähigkeit bei gleichzeitig kurzen Testzeiten vereint. Der hohe Automatisierungsgrad sowie die Transportfähigkeit des Systems ermöglichen eine präzise und schnelle Vor-Ort-Analyse. Beispielweise wäre ein Einsatz des MCR3 für Screenings von Muschelproben in Fischerhäfen oder an zentralen Stellen, die Milch bzw. Saft verarbeiten und abfüllen möglich. Der MCR3 ermöglicht dabei eine zeitnahe Detektion verschiedener Proben durch die direkte Kopplung der Probenanalyse mit deren Auswertung. Dadurch können Aussagen über den Toxingehalt in Proben getroffen und die Einführung kontaminierter Lebensmittel in den Handel bzw. letztendlich zum Verbraucher verhindert werden.

Für die dargestellten Szenarien wurden Durchfluss-Chemilumineszenz-Mikroarrays für die simultane Analyse von Biotoxinen entwickelt, die anhand ihrer Anwendungsbereiche klassifiziert wurden (Abbildung 1.1). Es handelte sich dabei zum einen um Mikroarrays zur Überwachung von Lebensmitteln, im Speziellen für Speisemuscheln, zum anderen um Mikroarrays für Routinekontrollen zum präventiven Schutz der Bevölkerung vor potentiellen biologischen Kampfstoffen.

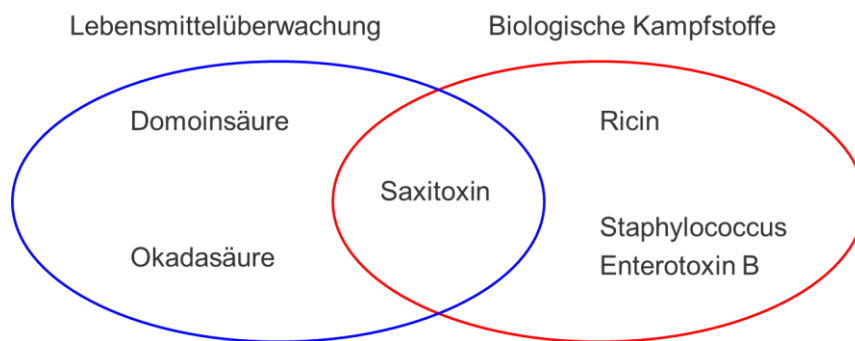


Abbildung 1.1: Einteilung der Biotoxine in zwei verschiedene Anwendungsbereiche.

Die meisten Methoden zur Detektion für Kontaminanten in Speisemuscheln spezialisieren sich auf ein bestimmtes Toxin bzw. auf die zugehörige Toxinfamilie. Im Gegensatz dazu soll ein Multiplex-Verfahren auf dem MCR3 entwickelt werden, dass die bekanntesten natürlich vorkommenden Kontaminanten DA, OA und STX aus drei verschiedenen Toxinfamilien schnell, sensitiv und parallel nachweist. Bei OA, DA und STX handelt es sich um niedermolekulare Biotoxine, so dass die Detektion dieser Toxine über einen indirekt kompetitiven Immunoassay mittels spezifischer Antikörper erfolgt. Das indirekt kompetitive Format erfordert die Immobilisierung der Analyte auf der chemisch-modifizierten Oberfläche der Mikroarray-Chips, wodurch ein paralleler Nachweis ermöglicht wird. Um eine hohe Automatisierbarkeit zu gewährleisten, soll ein regenerierbarer Chemilumineszenz (CL)

Mikroarray entwickelt werden, welcher eine interne Kalibrierung sowie die anschließende Bestimmung von Proben mit nur einem Mikroarray-Chip ermöglicht. Für die Identifizierung und Quantifizierung der Phycotoxine werden in Puffer dotierte Toxine und belastete Muschelproben gemessen. Da es kein vorgegebenes Standardverfahren zur Toxinfamilien-übergreifenden Extraktion gibt, werden verschiedene Extraktionsmittel anhand ihrer Anreicherungs-Effektivität untersucht. Ein abschließendes Ziel ist die Überprüfung, ob die festgelegten Grenzwerte für Phycotoxine mit dem MCR3 eingehalten werden.

Der zweite Anwendungsbereich des Durchfluss-Chemilumineszenz-Mikroarrays fokussiert sich auf biologische Kampfstoffe. Hierbei spielen die hochmolekularen Proteotoxine Rizin und SEB eine wichtige Rolle. Das niedermolekulare STX ist auch für diese Anwendung von Bedeutung, da es als chemische Waffe TZ bekannt wurde [16]. Die Schwierigkeit dieser Anwendung bestand in der Realisierung des parallelen Ablaufs zweier unterschiedlicher Assay-Prinzipien auf einem Mikroarray-Chip. Rizin und SEB werden mittels Sandwich-Immunoassay nachgewiesen, hingegen wird bei der Detektion von STX ein indirekt kompetitiver Immunoassay angewandt. Das Ziel der zweiten Aufgabe bestand somit darin, Biotoxinen mit stark unterschiedlichen Molekulargewichten parallel zu messen. Um eine hohe Nachweisstärke der Assays zu erhalten, werden zunächst die Messbedingungen optimiert. Anschließend soll die Identifizierung und Quantifizierung der Biotoxine in Puffer gezeigt werden, da im Vergleich zu den Phycotoxinen keine bis wenige Realproben existieren. Des Weiteren soll der Mikroarray-Chip hinsichtlich der Reproduzierbarkeit, Nachweisgrenzen und Wiederfindungen charakterisiert werden.

2 Theorie

2.1 Biotoxine

2.1.1 Phycotoxine

Von den 4000 bekannten Algenarten ist nur ein geringer Anteil, etwa 60 – 80 Spezies, in der Lage, Phycotoxine zu produzieren [17]. Die entscheidenden Produzenten der Phycotoxine sind dabei verschiedene Arten von Dinoflagellaten (Geiselalgen) und Diatomeen (Kieselalgen), die vor allem im Phytoplankton vorhanden sind [18]. Die Konzentration der Muscheltoxine im Phytoplankton ist (normalerweise) sehr gering. Jedoch können veränderte Klimabedingungen mit heftigen Regenfällen, starker Sonneneinstrahlung, erhöhter Meerestemperatur und der damit verbundenen Präsenz von Nährstoffen dazu führen, dass sich einige Algen massenhaft vermehren [8, 17]. Für eine Massenvermehrung können auch anthropogene Einflüsse durch Landwirtschaft und Industrie, die zu einer hohen Verschmutzung der Meere führen, verantwortlich sein [19]. Eine massenhafte Vermehrung giftiger Algen wird auch als toxische Algenblüte (HAB, *harmful algal bloom*) bezeichnet. Es können Konzentrationen von bis zu 20.000 Dinoflagellaten pro mL Meerwasser [20] erreicht werden, wodurch es bei manchen Algenarten zu einer sichtbaren Rotfärbung des Meeres (*red tide*) kommen kann.

In den letzten Jahrzehnten haben sich die toxischen Algenspezies bezüglich der Häufigkeit ihres Auftretens und der geographischen Verteilung weltweit stark verbreitet. Diese Verbreitung kann auch anhand der steigenden Anzahl von Muschelvergiftungen beim Menschen beobachtet werden. Die gemeldeten Fälle kommen beispielsweise aus Japan [21], Kanada [22], Großbritannien [23], Griechenland [24], Alaska [25] und Neuseeland [26]. Auch in Kroatien [27] und China [28] wurden toxische Algenspezies in Muscheln entdeckt, die aber nicht zu Vergiftungen von Menschen geführt haben. Global betrachtet sind Phycotoxine für über 60.000 Muschelvergiftungen pro Jahr verantwortlich, die in 1,5% der Fälle sogar tödlich enden [29]. Aber Muscheltoxine stellen nicht nur ein Problem im Hinblick auf Vergiftungen beim Menschen dar, sondern können auch zu massenhaftem Sterben von Tieren führen, die von der marinen Nahrungskette abhängen. Zudem können Phycotoxine schwere Folgen für wichtige Wirtschaftszweige wie Fischerei oder Muschelzuchtbetriebe haben [19, 23].

Algen werden von verschiedenen Muschelarten als Nahrungsquelle genutzt. Während der vermehrten Algenblüte kommt es zu erhöhten Konzentrationen an Phycotoxinen im Phytoplankton, die durch Speisemuscheln wie zum Beispiel Miesmuscheln, Jakobsmuscheln,

Sandmuscheln und Austern aufgenommen werden. Die Toxine werden im Gewebe der Muscheln einlagert und akkumuliert ohne die Lebensfähigkeit der Muscheln zu beeinträchtigen. Dabei können sehr hohe Konzentrationen [16] angereichert werden, so dass der Verzehr der kontaminierten Muscheln beim Menschen eine schwere Muschelvergiftung mit Durchfall und Lähmungen auslösen kann. In schwerwiegenden Fällen kann diese sogar tödlich enden. Neben Muscheln können auch Schalentiere und einige Fischarten Phycotoxine anreichern. Verglichen mit Muscheln sind die angereicherten Konzentrationen jedoch viel geringer. Die Phycotoxine werden anhand der unterschiedlichen Krankheitssymptome, die sie beim Menschen hervorrufen, in sieben relevante Kategorien eingeteilt [30].

- *ASP - Amnesic Shellfish Poisoning*
- *AZA - Azaspiracid Shellfish Poisoning*
- *CFP - Ciguatera Fish Poisoning*
- *DSP - Diarrhetic Shellfish Poisoning*
- *NSP - Neurologic Shellfish Poisoning*
- *PSP - Paralytic Shellfish Poisoning*
- *Puffer Fish Poisoning*

Voraussagen über den Toxingehalt in Algenblüten sind schwierig, da auch nicht toxinproduzierende Algen zu Algenblüten fähig sind. Des Weiteren ist eine Algenblüte auch keine notwendige Voraussetzung für die Kontamination von Muscheln, da einige Muschelarten durch stete Akkumulation von Phycotoxinen, diese ganzjährig enthalten [31]. Durch äußere Merkmale sind nicht kontaminierte Muscheln von giftigen nicht zu unterscheiden, so dass eine permanente Gefahr für den Verbraucher besteht, an einer Muschelvergiftung zu erkranken. Zum Schutz des Verbrauchers müssen lebende Speisemuscheln ständig auf Phycotoxine untersucht werden. Durch eine EU-Verordnung [32] wurden die maximal zulässigen Grenzwerte für Phycotoxine festgelegt, wobei keine Phycotoxine in der Gesamtmenge (im ganzen Tier oder in allen essbaren Teilen gesondert gemessen) enthalten sein dürfen, die die folgenden Grenzwerte übersteigen (Tabelle 2.1). Die Grenzwerte der Tabelle 2.1 beziehen sich dabei auf die ganze Toxinfamilie und sind nur für die bekanntesten Muschelvergiftungen, nämlich Gedächtnisstörungen hervorrufende Toxine (ASP-Toxins), Durchfall auslösenden Toxine (DSP-Toxins) und Lähmung auslösenden Toxine (PSP-Toxine) dargestellt.

Tabelle 2.1: Maximal zugelassene Grenzwerte für Phycotoxine in Muscheln.

ASP	DSP	PSP
20 mg/kg	160 µg/kg	800 µg/kg

Im Folgenden wird speziellen auf die Hauptvertreter der ASP-, DSP- und PSP-Toxine, die Domoinsäure (DA), Okadasäure (OA) und Saxitoxin (STX) eingegangen.

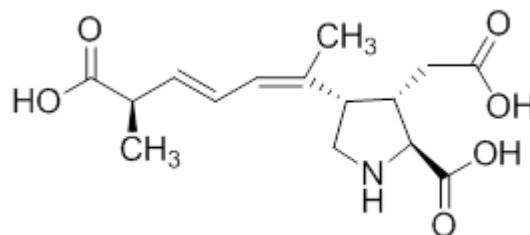
2.1.1.1 Domoinsäure

Vergiftungsfälle

Die ersten in der Literatur bekannten Fälle von ASP-Vergiftungen ereigneten sich im Jahre 1987 in Kanada, als über 150 Personen 48 Stunden nach dem Verzehr von gezüchteten Miesmuscheln deutliche Symptome einer Magen-Darm-Erkrankung mit starken Gedächtnisstörungen bzw. Gedächtnisverlust zeigten [33]. Davon mussten 19 Personen im Krankenhaus behandelt werden. Für 4 ältere Personen führte diese ASP-Vergiftung zum Tod. Als Verursacher dieser Vergiftungen konnte Domoinsäure identifiziert werden. Personen, die zwischen 60 – 290 mg ASP-Toxine aufgenommen hatten, zeigten je nach Höhe der Aufnahmemenge deutliche Vergiftungssymptome. Hingegen konnten bei einer Aufnahme von Domoinsäure im Bereich von 15 – 20 mg keine Symptome beobachtet werden [20]. Davon wurde abgeleitet, dass gezüchtete Muscheln eine Menge von 20 mg/kg DA in Muschelfleisch nicht überschreiten dürfen [34].

Struktur

Domoinsäure hat eine molare Masse von 311 Da und die chemische Struktur mit der Strukturformel $C_{15}H_{21}NO_6$. Diese ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

**Abbildung 2.1:** Struktur von Domoinsäure.

Domoinsäure ist eine cyclische Aminosäure, die aus einem Prolin-Ring, drei Carboxylgruppen und einer sekundären Aminogruppe besteht. Es existieren 9 Isomere der

Domoinsäure, das C5'Diastereomer und die Isodomoinensäuren A bis H [35]. Bei einer ASP-Vergiftung spielen die Isomere eine untergeordnete Rolle, da diese verglichen mit DA nur zu 10 - 20% in den marinen Organismen angereichert werden [20]. DA und ihre Isomere sind bei Raumtemperatur und Sonneneinstrahlung stabil. Durch Hitze, extreme pH-Werte oder ultraviolettes Licht wird isoliertes DA in ihre Isomere umgewandelt. Jedoch bewirkt Kochen oder Autoklavieren bei 121°C nur eine Abnahme von 3% von der ursprünglichen DA-Konzentration in Muschelfleisch [36]. Somit bietet das Abkochen von Muscheln keinen Schutz vor einer ASP-Vergiftung.

Wirkmechanismus

Aufgrund seines Wirkmechanismus (Abbildung 2.2) wird Domoinsäure zu der Klasse der Kainsäuren gezählt [37]. Bei Domoinsäure sowie Kainsäure handelt es sich um strukturelle Analoga der Glutaminsäure, die an die Glutamat-Rezeptoren im zentralen Nervensystem binden. DA besitzt jedoch eine weitaus höhere Affinität zu den Glutamat-Rezeptoren als Kainsäure [38] und kann an drei verschiedene ionentropen Glutamat-Rezeptoren, den Kainat-Rezeptor, den AMPA-Rezeptor (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat) und den NMDA-Rezeptor (*N*-Methyl-D-Aspartat) binden.

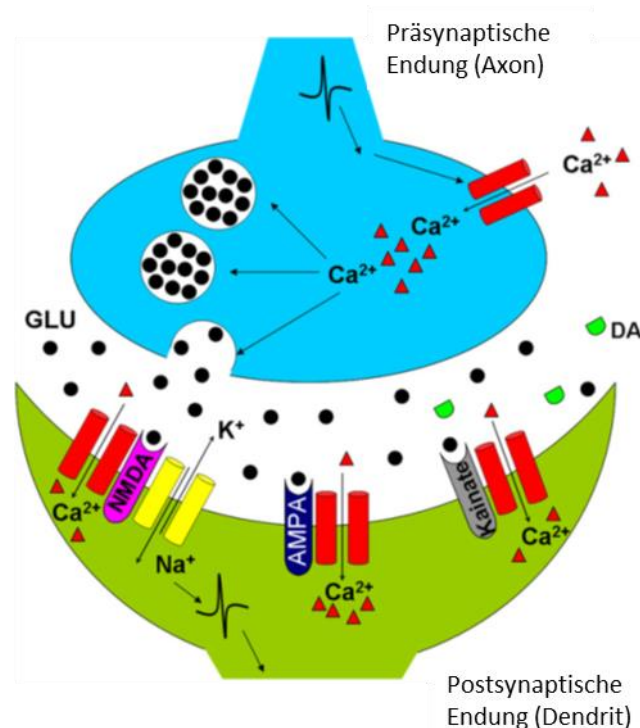


Abbildung 2.2: Wirkungsmechanismus von Domoinsäure [37].

Glutamat-Rezeptoren sind für die synaptische Reizweiterleitung im zentralen Nervensystem zuständig. Im Gegensatz zu Glutamat führt die Bindung von DA an die Rezeptoren zu einer

konstanten Einschleusung von Ca^{2+} - und Na^{+} -Kationen in die Nervenzellen und dementsprechend zu einer Depolarisierung der Nervenzelle [37]. Als Folge der überschüssigen intrazellulären Konzentration an Ca^{2+} kommt es zu Störungen der zellulären Funktionen und schließlich zum neuronalen Zelltod. Glutamat-vermittelte Reizleitungssysteme spielen hauptsächlich in den Regionen des Gehirns eine Rolle, die für Lern- und Gedächtnisprozesse zuständig sind. Die beschriebene pharmakologische Wirkung bzw. die potentielle Toxizität der Domoinsäure ist jedoch nach oraler Aufnahme weitaus geringer, da nur geringe Mengen durch den Darm aufgenommen werden können. Zudem kann DA als hydrophiles Molekül nur schwer die Blut-Hirn-Schranke passieren [22].

Die Symptome einer ASP-Vergiftung treten nach 24 – 48 Stunden ein und äußern sich vor allem durch Übelkeit, Krämpfe, Erbrechen, Durchfall, Kopfschmerzen, Orientierungslosigkeit und Gedächtnisverluste [39] und können nach der aufgenommenen Menge an DA eingeteilt werden (Tabelle 2.2). Bei älteren oder körperlich schwachen Menschen können auch Koma oder Tod die Folge sein.

Tabelle 2.2: Symptome bei oraler Aufnahme [37].

Orale Aufnahme (mg DA/kg Körpergewicht)	Symptome
0,2 – 0,3	Keine Effekte
0,9 – 2,0	Schwache Symptome
1,9 – 4,2	Orientierungslosigkeit

2.1.1.2 Okadasäure

Zu der Gruppe der DSP-Toxine werden die Okadasäure und ihre Derivate, die Dinophysistoxine (DTXs) gezählt. Des Weiteren werden auch die Pectenotoxine (PTXs) und Yessotoxine (YTXs) dieser Gruppe zugeordnet. Im Gegensatz zu OA und ihren Derivaten sind PTXs und YTXs nicht in der Lage, beim Menschen Durchfall auszulösen. Die Klassifizierung beruht somit nicht auf dem Effekt dieser Toxine, sondern auf der Tatsache, dass die DSP-Toxine eine sehr große Ähnlichkeit in ihren chemischen Strukturen haben und daher in kontaminierten Muscheln alle Toxine der DSP-Gruppe vorgefunden werden [35].

Struktur

Bei den DSP-Toxinen handelt es sich um Polyether. Okadasäure und ihre Derivate sind Polyether-Verbindungen, die aus Furan- und Pyran-ähnlichen Ringen aufgebaut sind, eine Carboxylgruppe besitzen und sich in der Anzahl und Position der Methylgruppen

unterscheiden [40]. Abbildung 2.3 zeigt die Struktur von OA. Die Summenformel lautet $C_{44}H_{68}O_{13}$ und die molare Masse beträgt 805 Da.

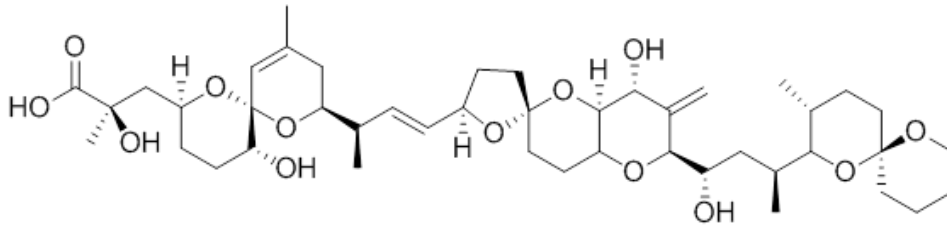


Abbildung 2.3: Struktur der Okadasäure.

DSP-Toxine sind lipophil und hitzestabil [40] und können wie die ASP-Toxine nicht durch Kochen inaktiviert werden. Die minimale Dosis, die zu Symptomen beim Menschen führen kann, wird auf 48 μg OA geschätzt [40]. Weitere Daten bezüglich der Toxizität von OA beim Menschen sind nicht bekannt. Die ersten Fälle einer DSP-Vergiftung wurden in den Jahren 1961 in den Niederlanden [41] und 1970 in Japan [42] gemeldet. Die DSP-Toxine kommen weltweit vor, treten aber besonders in Japan und Europa auf.

Wirkmechanismus

Nach dem Verzehr von kontaminierten Muscheln setzt die Wirkung innerhalb von 30 min bis einigen Stunden ein [35], wobei Durchfall das häufigste Symptom darstellt. Neben Durchfall können noch andere Symptome wie Übelkeit, Bauchschmerzen und Erbrechen auftreten. Eine Behandlung im Krankenhaus ist normalerweise nicht notwendig, da die Symptome spätestens nach 3 Tagen wieder abklingen. Unter den bisher bekannten DSP-Vergiftungen wurden keine tödlichen Verläufe berichtet.

Der Wirkmechanismus der zugrundeliegenden Durchfallerkrankungen lässt sich durch die stark hemmende Wirkung gegen die Serin-/Threonin-spezifischen Protein-Phosphatasen (PP) erklären. Betroffen hiervon sind vor allem die Phosphatasen des Typs PP1 und PP2A [43, 44], während PP2B nur bei hohen Konzentrationen von OA inhibiert wird. Serin-/Threonin-Protein-Phosphatasen sind Enzyme, die an vielen wichtigen Stoffwechselprozessen in eukaryotischen Zellen vor allem an der Dephosphorylierung verschiedener Proteine beteiligt sind. Über die Dephosphorylierung von Proteinen werden verschiedene Prozesse wie der Stoffwechsel, Transport und Sekretion in den Membranen, Kontraktionsfähigkeit der Muskulatur, Zellteilung oder der programmierte Zelltod reguliert [45]. Die Enzymhemmung führt einerseits zu einem gesteigerten Phosphorylierungsgrad von Proteinen, die die Ausscheidung von Natrium aus den Darmzellen steuern, und andererseits von Zytoskelett-

Proteinen, die die Permeabilität von gelösten Stoffen regulieren, wodurch wahrscheinlich Durchfall induziert wird. Aufgrund seines Wirkmechanismus ist OA auch ein potenter Tumorpromotor [46]. Bei chronischer Exposition kann es somit zur Förderung von Tumorbildungen im Verdauungssystem kommen.

2.1.1.3 Saxitoxin

Eine Besonderheit der PSP-Toxine ist, dass neben den Dinoflagellaten auch Süßwasser-Cyanobakterien in der Lage sind, diese Toxine zu produzieren.

Struktur

Zu der Gruppe der PSP-Toxine werden Saxitoxin und seine 57 Analoga gezählt [47]. Bei den PSP-Toxinen handelt es sich um natürliche neurotoxische Alkaloide, die eine gemeinsame chemische Grundstruktur besitzen, sich aber durch die Kombination verschiedener Substituenten an den Positionen R₁-R₄ unterscheiden. Namensgebend für die vier verschiedenen Untergruppen ist die Seitenkette der Position R₄, die in die Carbamat-, N-Sulfocarbamat-, Decarbamat- und Deoxycarbamat-Gruppe untergliedert wird (Abbildung 2.4 und Tabelle 2.3). Die PSP-Toxine zeigen große Unterschiede in ihrer Toxizität, wobei neben Saxitoxin die Analoga der Carbamat-Gruppe, insbesondere NEO und GTX1, und dcSTX die höchste biologische Aktivität besitzen [48]. Die Anwesenheit bzw. Zusammensetzung der PSP-Toxine variiert dabei je nach lokaler Verteilung, Saison sowie der Art der Toxin-produzierenden Algen und Muschelarten [20]. Nur ein Teil der relativ großen Anzahl der unterschiedlich substituierten PSP-Toxine wird von den Dinoflagellaten und Süßwasser-Cyanobakterien produziert. Die restlichen Analoga entstehen als Metabolite in verschiedenen Muschelarten, die die Analoga ineinander umwandeln können.

Saxitoxin selbst gehört zu der Carbamat-Gruppe und besteht aus einem Tetrahydropuringerüst. Es besitzt zudem zwei Guanidin-Gruppen, welche für die hohe Polarität des Moleküls verantwortlich sind. Die Summenformel ist C₁₀H₁₇N₇O₄ und die molare Masse beträgt 299 Da.

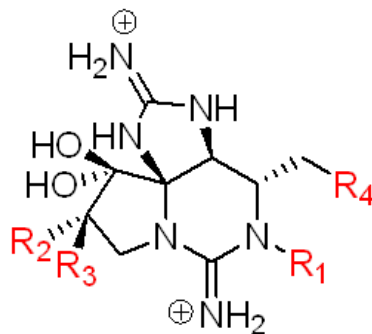


Abbildung 2.4: Struktur von Saxitoxin und seinen Analoga [49].

Tabelle 2.3: Zugehörige Substituenten an den Positionen R₁ - R₄ für Saxitoxin und seine Analoga.

Toxin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
STX	H	H	H	
NEO	OH	H	H	H ₂ N-COO
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	(Carbamat-)
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	
GTX5	H	H	H	
GTX6	OH	H	H	⁻ O ₃ S-NH-COO
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	(N-Sulfo-carbamat-)
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	
C3	OH	OSO ₃ ⁻	H	
C4	OH	H	OSO ₃ ⁻	
dcSTX	H	H	H	
dcNeo	OH	H	H	OH
dcGTX1	OH	OSO ₃ ⁻	H	(Decarbamat-)
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	
dcGTX4	OH	H	OSO ₃ ⁻	
doSTX	H	H	H	
doGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	H
doGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	(Deoxycarbamat-)

Wirkmechanismus

Die Toxizität des Neurotoxins Saxitoxin basiert auf der Blockade der Natriumkanäle von Nervenzellen [16, 50]. Mit seinen protonierten Guanidin-Gruppen bindet Saxitoxin an die Außenseite der Natriumkanäle und blockiert so die Durchtrittsstellen der Natriumionen durch die Nervenmembranen (Abbildung 2.5), wodurch die Reizweiterleitung verhindert wird. Die Bindung von Saxitoxin ist konzentrationsabhängig, reversibel und sehr spezifisch. Schon geringe Konzentrationen im Bereich von 10^{-9} M reichen aus, um die toxische Wirkung an den Nervenzellen hervorzurufen [51].

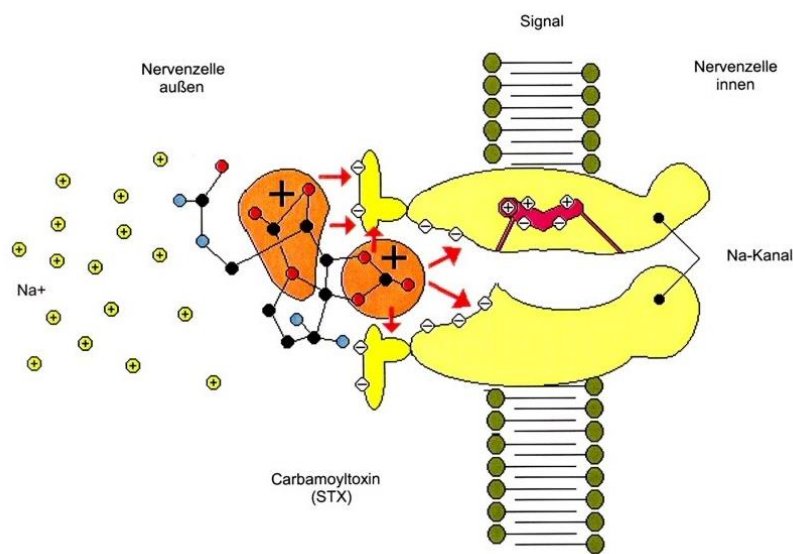


Abbildung 2.5: Wirkmechanismus Saxitoxins [16].

Saxitoxin ist wie die Domoin- und Okadasäure wasserlöslich und hitzestabil, wird jedoch unter stark alkalischen Bedingungen inaktiviert. Durch mehrminütiges Kochen der Muscheln wird die Konzentration von STX nicht merklich gesenkt [20], folglich bleibt das Risiko, an einer PSP-Vergiftung zu erkranken, bestehen. Eine durch STX induzierte Störung der Nervenfunktionen tritt meist schon 0,5 – 2 Stunden nach Verzehr der kontaminierten Muscheln ein, wobei die Symptome je nach Vergiftungsgrad variieren. Da das periphere Nervensystem betroffen ist, äußert sich die Vergiftung zunächst durch ein Kribbeln auf Zunge und Lippen, welches sich über Gesicht und Nacken auf die Extremitäten ausbreitet und anschließend in einem Taubheitsgefühl endet. Weitere Symptome sind Erbrechen, Durchfall, Verlust der Koordination und Atembeschwerden. Bei schweren Vergiftungen kommt es zu Muskelschwäche und Atemlähmung, die innerhalb von 2 – 12 Stunden zum Tod durch Erstickten führen kann. Die letale Dosis liegt für den Menschen bei 1 bis 4 mg [49]. Bei nicht

letalen Dosen tritt nach etwa 12 Stunden eine Besserung der Symptome ein, da Saxitoxin über den Urin ausgeschieden wird. [51, 52]

Vergiftungsfälle

Der erste Vergiftungsfall mit Saxitoxin wurde schon 1793 in der Literatur beschrieben [53], als ein Seemann auf der Insel British Columbia seiner schweren Vergiftung erlag. Bis 1958 wurden weitere 900 Fälle von Muschelvergiftungen durch STX mit ca. 200 Todesfällen beschrieben [54].

Verwendung von Saxitoxin als biologischer Kampfstoff

Neben den Proteotoxinen wie z.B. Botulinum-Toxin oder Rizin gehört Saxitoxin zu den giftigsten chemischen Substanzen, weswegen es im Chemiewaffen-Übereinkommen (CWÜ) [55] und im deutschen Kriegswaffenkontrollgesetz [56] aufgeführt ist. Saxitoxin sollte einst als biologischer Kampfstoff unter der Bezeichnung TX eingesetzt werden, um eine schnellere tödliche Wirkung von Gewehrmunition zu erzielen [16]. Das hohe Potential von Saxitoxin als biologischer Kampfstoff ist durch seine hohe Toxizität und Stabilität begründet, jedoch setzt die Beschaffung dieses Toxins der Verwendung Grenzen. Die erste chemische Synthese von Saxitoxin gelang im Jahre 1977 [57]. Die Synthese ist jedoch sehr aufwendig und weist eine sehr geringe Ausbeute auf, was die Beschaffung erheblich erschwert. Auch das Züchten von Muscheln zur Gewinnung größerer Mengen an Saxitoxin gestaltet sich als schwierig und nicht sehr lukrativ, da riesige Mengen der Muscheln, sogar im Tonnen-Maßstab, benötigt würden [58]. Neben der denkbaren militärischen bzw. terroristischen Verwendung wäre der Zusatz von STX in lokalen Anästhetika möglich [47], da es in kleinen Mengen die Wirkzeit auf das zwei bis dreifache verlängern kann [51].

Für alle genauer beschriebenen Phycotoxine, nämlich ASP-, DSP- und PSP-Toxine, existiert weder ein Impfstoff noch ein Gegenmittel, um sich vor Muschelvergiftungen zu schützen. Im Falle einer Vergiftung ist nur eine rein symptomatische Behandlung möglich.

2.1.2 Proteotoxine

2.1.2.1 Rizin

Rizin ist ein äußerst toxisches Lektin, welches in den Samen einer Pflanze, der Rizinusstaude (*Ricinus communis*) hergestellt wird. Die Samen enthalten das Rizin dabei in einer Menge von 3 – 5% [59]. Bei der Rizinusölherstellung fällt Rizin zudem in großen Mengen als

Abfallprodukt an und ist somit weltweit zugänglich. Die einfache Beschaffung dieser Pflanze sowie der genau bekannte Extraktionsprozess des Toxins machen Rizin zu einer attraktiven biologischen Waffe [60]. Neben der leichten Verfügbarkeit ist auch die hohe Toxizität (siehe Tabelle 1.1) von Rizin für eine potentielle Gefährdung für militärische bzw. terroristische Zwecke relevant, so dass Rizin neben Saxitoxin im Chemiewaffen-Übereinkommen [55] und im Kriegswaffenkontrollgesetz [56] aufgeführt ist. Das Center for Disease Control and Prevention (CDC) hat Rizin als bioterroristisches Agens der Sicherheitskategorie B eingestuft [10]. Agenzien dieser Kategorie können relativ einfach verbreitet werden, verursachen eine gemäßigte bis hohe Morbidiät sowie geringe Mortalität und stellen besondere Anforderungen an die Diagnostik.

Durch terroristische Gruppierungen könnte das hochgiftige Rizin zum Beispiel über die Trinkwasserversorgung, Lebensmittel oder als Aerosol in Umlauf gebracht werden [61]. Ein gezielter Anschlag auf die Lebensmittelverarbeitung oder Trinkwasserversorgung erscheint am wahrscheinlichsten, zumal das Protein nicht durch Chlorierungs- und Desinfektionsmaßnahmen deaktiviert wird. Die Freisetzung von Rizin in Form von Aerosolen wird durch die geringe Stabilität des Proteins erschwert. Durch Wärme, UV-Strahlung, extreme pH-Werte und oxidierende Bedingungen wird das Toxin inaktiviert [62]. Um in die Lunge zu gelangen, müssen die Partikel in einer inhalierbaren Größe vorliegen [60]. Das Versprühen von Partikeln führt zu hohen mechanischen Belastungen, welche bei Rizin zu einer unschädlichen Wirkung führen können. Zudem wären beträchtliche Mengen von Rizin in Aerosolform nötig [63], wodurch eine großflächige Verteilung im Sinne einer Massenvernichtungswaffe verhindert wird. Während des zweiten Weltkriegs wurde von den Briten und Amerikanern überlegt, eine sogenannte W-Bombe einsetzen, die als Bestandteil unter anderem Rizin enthielt, wozu es aber nie gekommen ist [63]. Im Iran-Irak-Krieg der 80er Jahre wurde die Wirkung von mit Rizin angereicherten Waffen in Tierversuchen getestet. Die Feldversuche mit den mit Rizin gefüllten Granaten zeigten keinen Erfolg, so dass deren weitere Entwicklung für eine biologische Kriegsführung nicht weiter verfolgt wurde [64]. Die schwierige Erzeugung von einem Rizin-Aerosol führte dazu, dass die Verwendung von Rizin als biologischer Kampfstoff bis jetzt auch nur von Einzeltätern bzw. für Einzelziele bekannt ist. 1978 wurde in Großbritannien ein Attentat auf den bulgarischen Journalisten Georgi Markov verübt. Mit einer Regenschirmspitze wurde ihm eine mit Rizin versehene Kugel ins Bein gestochen, was nach drei Tagen zu seinem Tod durch Herzversagen führte. Es konnte aber nicht im Labor nachgewiesen werden, dass es sich dabei tatsächlich um Rizin gehandelt hat [65]. 2003 sowie 2004 wurden Briefe mit Rizin sichergestellt, die an den

amerikanischen Senat und das Weiße Haus adressiert waren [66]. Im Januar 2003 kam es zur Verhaftungen mehrerer Männer, da Spuren des Toxins in verschiedenen Londoner Wohnungen gefunden wurden [67].

Aufnahmewege

Eine unbeabsichtigte Vergiftung mit Rizin wie z.B. durch Verschlucken der Rizinussamen, ist sehr unwahrscheinlich. Kommt es dennoch zu einer Vergiftung mit Rizin, ist die Art der Aufnahme für das Ausmaß der toxischen Wirkung (LD_{50}) entscheidend. In Tierversuchen mit Mäusen konnten dabei folgende Werte bestimmt werden (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Vergleich der Toxizität von Rizin für verschiedene Aufnahmewege bei Mäusen.

Aufnahmeweg	Toxizität (LD_{50}) [mg/kg]
Oral	20 – 30
Injektion	0,05 – 0,1
Inhalation	0,003 – 0,05 (Partikel < 5 μ m)

Rizin als hydrophobes Molekül wird grundsätzlich nicht über die Haut aufgenommen, somit sollte reiner Hautkontakt zu keiner Vergiftungserscheinung führen. Es können lediglich Hautirritationen auftreten [60]. Die orale Aufnahme von Rizin ist verglichen mit einer Aufnahme durch Inhalation oder Injektion weitaus weniger gefährlich. Durch die geringe Stabilität und Säureempfindlichkeit des Proteins wird schon ein Großteil der toxischen Wirkung durch die sauren Bedingungen im Magen aufgehoben. Werden dennoch Rizinus-Samen verschluckt, ist die Gefahr einer Vergiftung bei unzerkauerten Samen mit einer intakten Hülle sehr gering. Samen mit einer beschädigten Hülle bergen ein größeres Risiko [68]. Besonders für Kinder könnte das Verschlucken solcher Samen schon tödliche Folgen haben. Die orale Toxizität beim Menschen wird auf 1 – 20 mg/kg geschätzt [60]. Um einen Menschen zu töten, reichen oftmals schon winzige Mengen von Rizin aus, wobei der spezielle Wirkmechanismus von Rizin Aufschluss über die hohe Toxizität gibt.

Struktur & Wirkmechanismus

Bei Rizin handelt es sich um ein heterodimeres Glykoprotein [69], welches aus zwei Polypeptiden, einer A-Kette (32 kDa) und einer B-Kette (34 kDa) besteht (Abbildung 2.6).

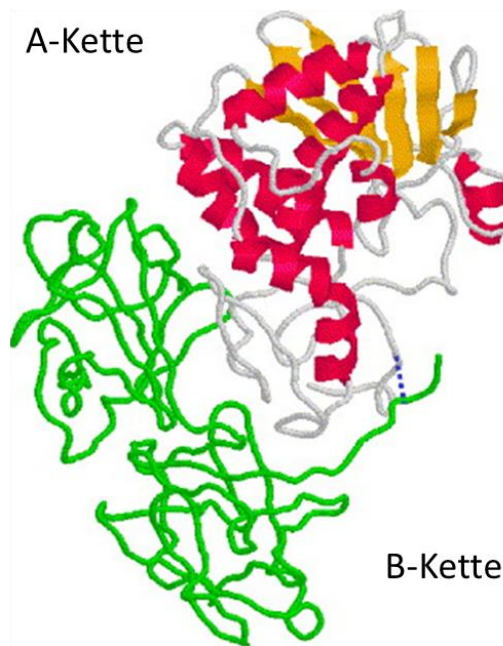


Abbildung 2.6: Dreidimensionale Struktur von Rizin [70].

Rizin wird der Familie der Ribosomen-inaktivierenden Proteine Klasse II (RIP II) zugeordnet. Alle Proteine dieser Klasse bestehen aus einer A-Kette, einem Ribosom-inaktivierenden Enzym, welche kovalent durch eine Disulfidbindungen mit einem N-Acetylgalactoseamin bindenden Lektin (B-Kette) verbunden ist. Die katalytisch inaktive B-Kette dieses Proteinkomplexes ermöglicht das Eindringen in das Zytosol [60]. Die B-Kette bindet dabei an Zellen, die auf der Zelloberfläche Glykolipide sowie Glykoproteine mit terminalen Galaktoseresten aufweisen [69, 71]. Eine weitere Möglichkeit für die Bindung von Rizin sind Mannose-Rezeptoren [72], wobei durchschnittlich 10^6 bis 10^8 Rizinmoleküle an eine Zelle binden können [73]. Von der Zelloberfläche wird das Rizin von Endosomen aufgenommen. Die Endosomen transportieren dieses dann entweder zur Zelloberfläche zurück oder entwickeln sich zu einem Lysosom, in dem das Rizin verdaut wird. Das Toxin kann aber auch durch die trans-Golgi-Netzwerkmembran in das Endoplasmatische Retikulum überführt werden und schließlich so ins Zytosol gelangen (Abbildung 2.7).

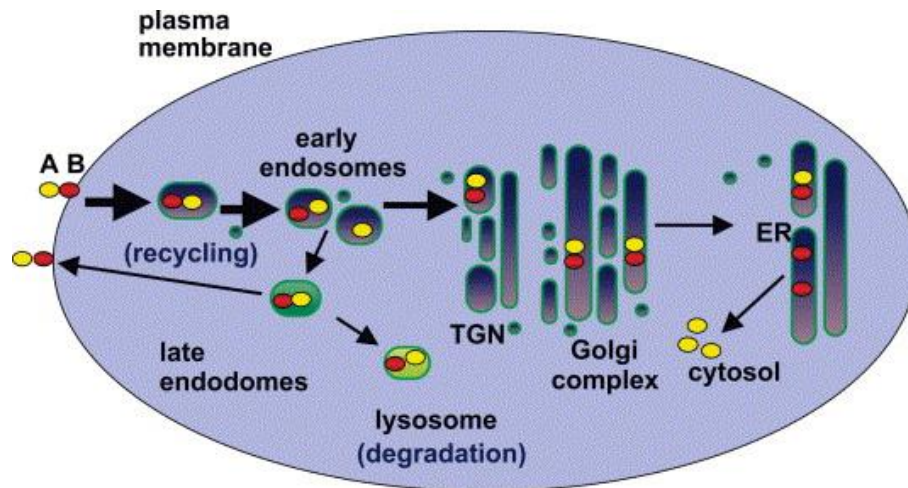


Abbildung 2.7: Mögliche Transportwege von Rizin in Zellen [70].

Um seine volle enzymatische Aktivität zu erreichen, muss die B-Kette von der A-Kette durch Spaltung der Disulfidbrücke getrennt werden [73]. Im Zytosol wirkt Rizin als Inhibitor der ribosomalen Proteinbiosynthese. Der enzymatisch aktive Teil von Rizin kann dabei über 2000 Ribosomen pro Minute inaktivieren, so dass bereits das Eindringen weniger Moleküle in das Zytosol einen dramatischen Effekt für die Zelle hat [74]. Die ribosomale Proteinbiosynthese wird gehemmt, indem eine spezifische Adeninbase der eukaryotischen ribosomalen 28S RNA depuriniert wird [69, 71]. Die Hydrolyse der Adeninbase verhindert die Anbindung des Elongationsfaktors. Die blockierte Proteinbiosynthese führt letztendlich zur Apoptose der Zelle [70].

Die Auswirkungen einer Rizinvergiftung auf den Körper hängen stark von dem Aufnahmeweg ab. Auch treten die Symptome nicht sofort ein, sondern erst nach einigen Stunden. Wurde Rizin eingeatmet, führt das zu schweren Schädigungen der Lunge, Lungenödemen und Entzündungen. Bei einer Injektion werden Lymphgefäße, Leber, Niere und Milz angegriffen. Eine orale Aufnahme kann dagegen Entzündungen des Magen-Darm-Traktes (Gastroenteritis), Krämpfe, Schock und Nierenversagen zur Folge haben, wobei Nervenzellen, Herz und Milz beeinträchtigt werden. Nach einigen Tagen kommt es zur Dehydrierung, vermindertem Harndrang, niedrigem Blutdruck und Multiorganversagen. Der Tod tritt nach 3 – 5 Tagen durch Kreislaufstillstand ein [60, 72, 73].

Das Toxin kann leicht durch eine 10 minütige Temperatureinwirkung von 80°C unschädlich gemacht werden [59]. Nach Aufnahme in den Körper existiert jedoch noch kein Gegenmittel für Rizin, auch ein Impfstoff ist nicht verfügbar [75]. Bei einer Rizinvergiftung können demnach nur unterstützende lebenserhaltende Maßnahmen eingeleitet werden. Als Konsequenz wird nach pharmakologisch aktiven Substanzen gesucht, die die Zellen vor einer

Rizin-Vergiftung schützen können. Hierfür sind die Wirkstoffe Retro-1 und Retro-2 (Abbildung 2.8) zu nennen, die als Gegenmittel eingesetzt werden könnten [76].

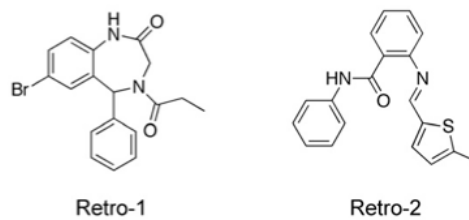


Abbildung 2.8: Potentielle Gegenmittel bei einer Rizin-Vergiftung [76].

Die Wirkung dieser Moleküle beruht auf einer Unterbrechung des Transports von Rizin in das *trans*-Golgi-Netzwerk und verhindert so die schädliche Freisetzung des Toxins ins Zytosol. Retro-2 konnte schon erfolgreich bei Mäusen getestet werden. Auch eine Immunisierung mit dem inaktiven Toxoid wäre denkbar [72], um sich vor Rizin zu schützen. Weiterhin soll das Potenzial der Bioaktivität des Toxins von der pharmazeutischen Forschung genutzt werden, um die zelltötende Wirkung von Rizin auf bestimmte Zellen, insbesondere Krebszellen zu lenken [73]. Hier wird die Tatsache genutzt, dass auf der Oberfläche von Krebszellen Zucker deutlich stärker ausgeprägt sind als bei den anderen Zellen und somit bevorzugt von Rizin gebunden werden.

Rizin-Surrogat: Agglutinin

Neben Rizin ist in den Samen der Rizinusstaude ein weiteres Toxin, das *Ricinus communis* Agglutinin enthalten [77]. Bei Agglutinin handelt es sich um tetrameres Glykoprotein (Abbildung 2.9), welches aus zwei Rizin-ähnlichen Heterodimeren besteht, die durch nicht kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Agglutinin ist weitaus weniger toxisch als Rizin, hat jedoch die Auflösung roter Blutkörperchen zur Folge [60]. Aufgrund der ähnlichen Strukturen können bei der Detektion Kreuzreaktivitäten auftreten.

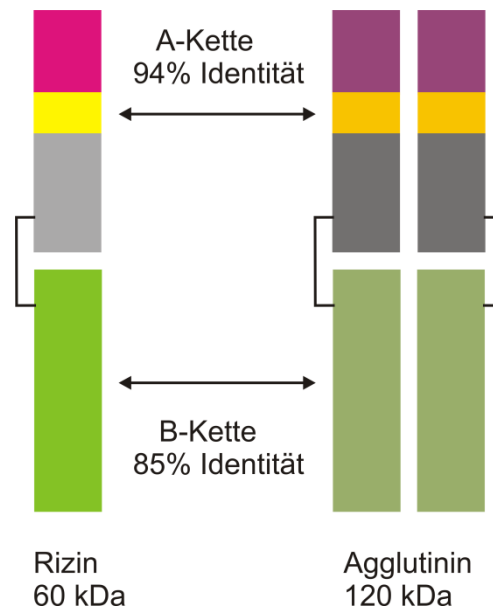


Abbildung 2.9: Vergleich des strukturellen Aufbaus von Rizin und Agglutinin in Anlehnung an [78].

2.1.2.2 Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)

SEB in Lebensmitteln

Bei Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) handelt es sich um ein Enterotoxin, welches von einem gram-positiven, fakultativ anaeroben und pathogenen Bakterium, *Staphylococcus aureus* hergestellt wird. Das Bakterium kommt ubiquitär vor und ist vor allem in hohen Keimzahlen auf Schleimhäuten und auf der Haut vorhanden [2]. Durch Niesen oder verletzte Hautstellen können Kontaminationen bei der Verarbeitung von Lebensmitteln auftreten. Eine Übertragung der Keime ist auch über Insekten wie Fliegen oder Schaben möglich. Eine weitere Kontaminationsmöglichkeit der Lebensmittel stellen entzündete Euter von Kühen dar [7]. Bei unzureichend gekühlten Lebensmitteln kann sich *S. aureus* innerhalb kürzester Zeit massiv vermehren und Enterotoxine produzieren. Durch Pasteurisierung wird das Bakterium abgetötet [79]. Im Gegensatz dazu weisen die hitzeresistenten *S. aureus*-Enterotoxine eine erhebliche Stabilität auf. Sogar nach einigen Minuten bei Temperaturen über 100°C zeigen einige Enterotoxine noch eine biologische Aktivität auf, was ein großes Problem für die Sicherheit von Lebensmitteln darstellt [80]. Zudem sind die Proteasen des Verdauungstraktes hauptsächlich Pepsin nicht in der Lage, diese Enterotoxine zu spalten und somit zu inaktivieren, was schlussendlich zu den Lebensmittelintoxikationen führt.

SEB als bioterroristisches Agens

Wie Rizin wurde auch SEB von der CDC als ein Agens der Kategorie B eingestuft [10]. SEB wird aufgrund seiner leichten Verfügbarkeit, einfachen Verbreitung und schnellen Wirkung ein terroristisches Potenzial beigemessen. Denkbar ist bei SEB eine vorsätzliche Kontamination von Lebensmitteln, Anschläge auf die Trinkwasserversorgung oder die Ausbringung als Aerosol [75, 81]. Durch Kultivierung im Nährmedium lässt sich das Bakterium leicht vermehren und kann dazu angeregt werden, SEB zu produzieren. Dieses lässt sich gut akkumulieren und könnte nach Aufreinigung aufgrund der hohen Stabilität als Aerosol versprüht werden. Das Toxin weist kein hohes Mortalitätspotenzial auf, wodurch die meisten Vergiftungen mit SEB nicht letal verlaufen. Jedoch könnten sich Terroristen die Eigenschaft zu Nutze machen, dass SEB schon in geringen Mengen toxisch ist, die Wirkung schnell einsetzt und den Menschen handlungsunfähig macht. Ein Beispiel genau dieser Anwendung war die Verabreichung von SEB an Hitlers Reichsminister Hjalmar Schacht von der US Army Chemical Corps' Special Operations Division, um seine Teilnahme an einer wichtigen Konferenz zu verhindern [63].

Struktur

Das Bakterium ist in der Lage, eine ganze Reihe verschiedener Enterotoxine zu produzieren. Bekannt sind derzeit unter anderem das „toxic shock syndrome toxin 1“ (TSST-1) sowie viele verschiedene Serotypen wie SEA, SEB und SEC, wobei SEC zusätzlich noch in die drei Subtypen SEC1, SEC2 und SEC3 eingeteilt wird. Weitere Serotypen sind SED, SEE und SEG bis SEX. [82] Die verschiedenen Enterotoxine weisen eine enge Verteilung der molaren Massen zwischen 25 - 29 kDa auf und besitzen eine Sequenzidentität von 20 - 80% [80]. Anhand kristallographischer Strukturaufklärung konnte ein sehr ähnlicher dreidimensionaler Aufbau der Enterotoxine festgestellt werden. Abbildung 2.10 zeigt beispielhaft die Struktur des Serotyps SEB, der eine molare Masse von 28,4 kDa besitzt [6].

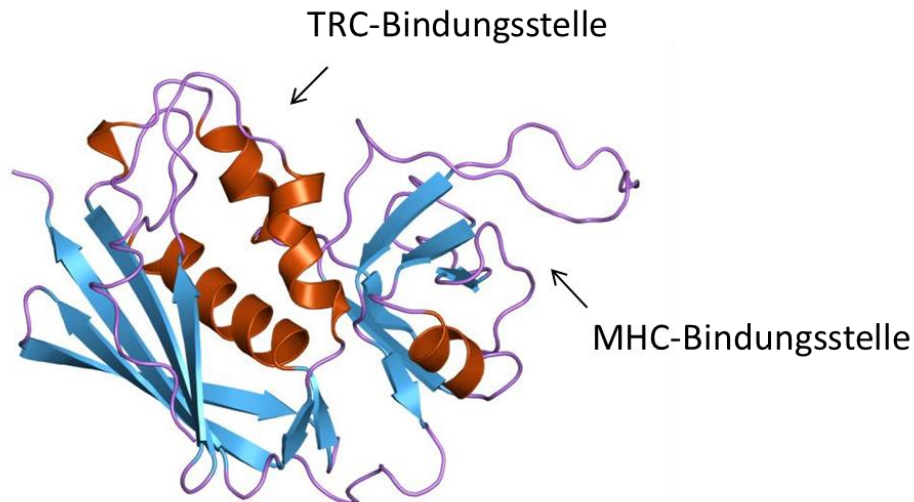


Abbildung 2.10: Struktur von SEB [83], wobei die α -Helices in rot, die β -Faltblätter in blau und die Schleifen in lila dargestellt sind.

Die Sekundärstruktur des Polypeptids setzt sich aus zwei großen Domänen zusammen, die über sechs Schleifen miteinander verbunden sind. Die erste Domäne wird auch als aminoterminaler Oligosaccharid- bzw. Oligonukleotid-bindende Einheit bezeichnet und besteht aus fünf β -Faltblättern und drei α -Helices [84]. Die β -Faltblatt-Struktur dieser Domäne besitzt zudem zwei Cysteinreste, die über eine Disulfidbindung verknüpft sind. Dadurch wird eine charakteristische Schleife gebildet, die aus dem Molekül herausragt und somit sehr beweglich ist [85]. Ihr wird dabei eine Bedeutung für die emetische Aktivität des Staphylococcus Enterotoxins B zugeschrieben. Die zweite Domäne ist aus zueinander gegenläufigen β -Faltblättern aufgebaut und ist auch als Carboxy-terminale Domäne bekannt [84].

Wirkmechanismus

SEB sowie die anderen Enterotoxin-Serotypen werden zu den Superantigenen gezählt und bewirken eine Dysregulation des Immunsystems, wobei sie ihre Wirkung am Gastrointestinaltrakt entfalten. Wie die Abbildung 2.10 zu erkennen gibt, ist SEB ein bifunktionelles Molekül, welches zwei Bindungsstellen besitzt. Eine Bindungsstelle ist verantwortlich für die Bindung an die MHC-II-Moleküle der Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die andere für die Bindung an die $V\beta$ -Elemente der T-Zell-Rezeptoren (TCR $V\beta$) [80, 86]. Als Superantigen ist SEB in der Lage, die Peptid-beladenen MHC-II-Moleküle mit den T-Zell-Rezeptoren zu vernetzen, wobei es außerhalb ihrer Peptidbindungsstelle bindet (Abbildung 2.11). Als Folge dieser Vernetzung kommt es zur Stimulierung der nicht-spezifischen Proliferation von T-Zellen [6]. Im Vergleich zu Antigenen, die eine von 10.000

T-Zellen aktivieren, wird angenommen, dass Superantigene bis zu einer von fünf T-Zellen stimulieren können [81]. Die Superantigen-vermittelte Aktivierung führt letztendlich zur massenhaften Freisetzung von Cytokinen. Die unkontrollierte Ausschüttung der Cytokine scheint die Ursache für das toxische Schock-Syndrom (TSS) zu sein [86].

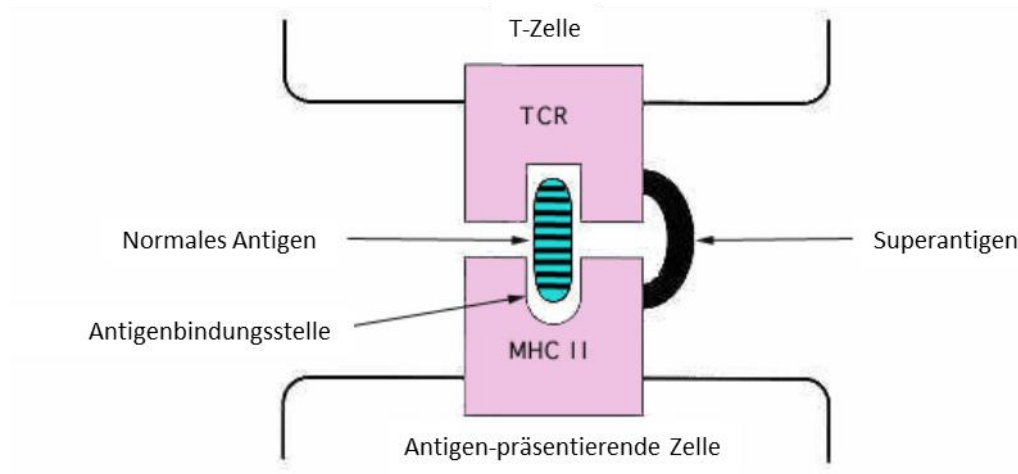


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Superantigenen [6].

Innerhalb von 2 bis 8 Stunden treten die ersten Symptome beim Menschen ein. Bei Augen- oder Hautkontakt entstehen Irritationen und Entzündungen. Bei Inhalation sind die Symptome Muskel- und Kopfschmerzen, zudem tritt hohes Fieber um die 40°C auf, welches bis zu 2 – 5 Tage anhalten kann. Selten kommt es zu Atemnot oder Lungenentzündungen. Eine orale Aufnahme führt zu Übelkeit, Bauchkrämpfen, Erbrechen und Durchfall. Hohe Dosen können zu einem septischen Schock und letztendlich auch zum Tod führen. [75, 81, 87]

Bei einer Verbreitung von SEB in Form von Aerosolen können schon 30 ng SEB eine Handlungsunfähigkeit verursachen, wobei eine Erhöhung der Dosis auf 1,7 µg SEB zum Tod führen kann [75]. Beim Menschen liegt bei inhalativer Aufnahme die effektive Wirkungs-dosis (ED₅₀) bei 0,0004 µg/kg und die halblethale Dosis (LD₅₀) bei 0,02 µg/kg [87]. Für andere Expositionswege existieren keine Daten bezüglich der ED₅₀- und LD₅₀-Werte. Bekannt ist aber, dass eine oral aufgenommene Dosis von 1 µg SEB ausreicht, um Erbrechen beim Menschen hervorzurufen [86]. Hingegen löst eine orale Dosis von 20 – 25 µg SEB deutliche Symptome einer starken Vergiftung beim Menschen aus [6].

Wie bei Rizin gibt es auch bei SEB weder ein Gegenmittel oder noch einen Impfstoff, so dass nur Maßnahmen zur Bekämpfung der Symptome eingeleitet werden können [6]. Eine SEB-Vergiftung ist mit einem hohen Elektrolyt- und Flüssigkeitsverlust verbunden, wodurch die

Maßnahmen für eine Behandlung darauf abzielen, diesen Verlust neben anderen auftretenden Symptomen zu bekämpfen.

2.2 Antikörper

2.2.1 Eigenschaften

Antikörper sind ein wichtiger Bestandteil des adaptiven Immunsystems bei der Bekämpfung von körperfremden Substanzen, den sogenannten Antigenen. Das Eindringen von Bakterien, extrazellulären Viren oder Makromolekülen (Proteine, Nukleinsäuren, Polysaccharide und Lipide) mit $M > 5 - 10 \text{ kDa}$ [88] in den Organismus von Vertebraten löst eine Immunantwort aus. Als Abwehrmaßnahme werden spezifische Antikörper in großen Mengen sezerniert, die die körperfremden Antigene erkennen. Dabei markieren Antikörper die Antigenmoleküle für den weiteren Abbau durch andere Komponenten des Immunsystems. Die Hauptaufgaben der Antikörper liegen somit in der Neutralisierung von Antigenen, Opsonierung und Aktivierung des Komplementsystems [89].

Wie spezifisch ein Antikörper ein bestimmtes Antigen bindet, hängt von der Bindungsstärke (Avidität) ab [90]. Antikörper erkennen bestimmte chemische Strukturen, spezifische Gruppen oder Aminosäuresequenzen auf dem Zielmolekül, die auch als Antigen determinante bzw. Epitop bezeichnet werden. Die Spezifität und Bindungsstärke zwischen Antikörper und Antigen beruht auf der strukturellen Komplementarität sowie der Fähigkeit, sich flexibel anzupassen, um komplementäre Gruppen vollständig miteinander wechselwirken zu lassen [91, 92]. Bei der Wechselwirkung von Antigen und Antikörper kommt es zur Ausbildung von verschiedenen nicht-kovalenten Bindungen, den Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräften, hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen. Die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung wird durch die Gesamtheit der nichtkovalenten Bindungen stabilisiert und führt zu einer starken reversiblen Bindung, wobei die Dissoziationskonstanten (K_d) im Bereich von 10^{-4} und 10^{-10} M liegen [92]. Als eine reversible Bindung unterliegt der Antigen-Antikörper-Komplex dem Massenwirkungsgesetz [89]. Über die Gleichgewichtskonstanten lässt sich die Affinität eines Antikörpers zu einem bestimmten Antigen berechnen.

2.2.2 Struktur und Aufbau

Antikörper werden auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet. Nach erfolgter Stimulierung durch körperfremde Antigene werden Antikörper durch B-Lymphocyten hergestellt. Insgesamt kommen fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen (IgA, IgD, IgE, IgG und

IgM) vor, die sich im Typ ihrer schweren Kette unterscheiden. Die Isotypen der schweren Ketten werden entsprechend als α , δ , ϵ , γ und μ bezeichnet. Bei den leichten Ketten werden nur zwei Arten (κ und λ) unterschieden. Die verschiedenen Klassen besitzen unterschiedliche Aufgaben im Organismus. Nach dem ersten Kontakt mit einem Antigen werden zunächst pentamere IgM im Serum vorgefunden. IgD, IgM und IgG sind Antigenrezeptoren, wobei IgG das häufigste im Blutserum des Menschen vorkommende Immunglobulin ist [92]. IgA tritt als Monomer, Dimer und Trimer auf und kommt nicht im Serum, sondern hauptsächlich in Schleimhäuten vor. Es ist verantwortlich für den Schutz gegen Bakterien und Viren. IgE schützt vor Parasiten und spielt bei allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle. Die verschiedenen Immunglobulinklassen besitzen eine molare Masse zwischen 150 – 950 kDa.

Die Struktur eines IgG (150 kDa) ist in Abbildung 2.12 dargestellt. Diese Antikörper bestehen aus vier Untereinheiten, den zwei identischen schweren (h, *heavy*) und leichten (l, *light*) Ketten. Die vier Untereinheiten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden und bilden zusammen ein Y-förmiges Molekül [92].

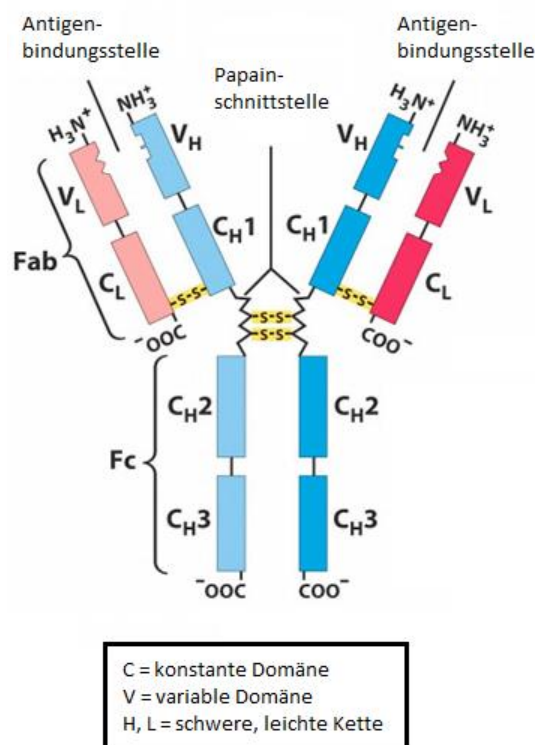


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung eines Immunglobulin G [91].

Innerhalb einer Kette unterscheidet man zwischen variablen Regionen V_L und V_H und konstanten Regionen C_L und C_H . Die konstanten Regionen der schweren Ketten liegen am C-terminalen Ende und bestehen aus drei Segmenten C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} . Zwischen den

Segmenten C_{H1} und C_{H2} liegt eine flexible Gelenkregion (*hinge region*), die es dem Antikörper erlaubt, den Winkel zu verändern, um sich einem Antigen bei der Bindung flexibel anzupassen. Diese Gelenkregion verbindet den konstanten Teil Fc (*crystallizable*) mit den zwei variablen Regionen Fab (*antigen binding*). Die variablen Regionen liegen am N-terminalen Ende beider Ketten und bilden die Antigenbindungsstelle. Die Antigenpezifität wird dabei durch die hypervariablen Regionen, den CDRs (*complementarity determining regions*) bestimmt. Durch kombinatorische Verknüpfung der codierenden Gene und somatische Mutation können über 10⁸ verschiedene Antikörper mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten gebildet werden [93]. Diese enorme Antikörpervielfalt ermöglicht eine Immunabwehr gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen und macht somit Antikörper zu einem bedeutenden Werkzeug in der Diagnostik.

2.2.3 Monoklonale und polyklonale Antikörper

Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper werden einem Tier Antigene in einem bestimmten Abstand injiziert. Diese Antigene stimulieren die Produktion von Antikörpern in vielen verschiedenen B-Lymphocyten. Gebräuchlich ist auch der Einsatz von Adjuvanzen, um die Antikörperkonzentration im Serum zu erhöhen [90]. Die sezernierten Antikörper erkennen verschiedene Oberflächenmerkmale desselben Antigens und können somit spezifisch verschiedene Epitope am Antigen binden. Zudem werden ca. 10 – 1000 verschiedene Antikörper gegen eine einzelne Antigen determinante erzeugt. Polyklonale Antikörper stellen somit eine Mischung von Antikörpern verschiedener Bindungsspezifität dar, die verschiedene Teile des Antigens erkennen. Nach einer bestimmten Zeitspanne wird dem Tier Blut entnommen und das Serum, welches alle Antikörper enthält, von den festen Blutbestandteilen abgetrennt. Eine weitere Aufreinigung und Abtrennung der gewünschten Antikörper erfolgt durch Protein A/G-Säulen. Vorteile in der Verwendung polyklonaler Antikörper liegen darin, dass nach Fragmentierung des Antigens oder Denaturierung wie der Spaltung von Disulfidbrücken und der damit verbundenen Konformationsänderung eine Erkennung weiterhin möglich ist. Jedoch kann die Bindung der Antikörper an viele Antigen determinanten zu unerwünschten Kreuzreaktivitäten führen. Weitere Nachteile sind, dass aufgrund individueller Synthesebedingungen ein Antiserum nie exakt reproduzierbar ist und die Antikörpergewinnung mit dem Tod des Tieres endet.

Im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern werden monoklonale Antikörper durch identische B-Lymphocyten bzw. durch Klone eines B-Lymphocyten hergestellt. Die Methode zur Herstellung identischer Antikörper wurde durch Köhler und Milstein etabliert, wobei die

wichtigen Schritte Immunisierung, Fusionierung, Selektion und Klonierung sind [93]. Nach der Injektion von Antigenen werden nach einer bestimmten Zeitspanne der Maus Milzzellen entnommen. Die gewonnenen B-Lymphozyten werden mit Myelomzellen fusioniert, wodurch man Hybridomazellen erhält, die die Eigenschaften beider Zellen besitzen. Zum einen können sich Hybridomazellen unendlich oft teilen, zum anderen werden ausschließlich identische monoklonale Antikörper produziert, die alle das gleiche Epitop eines Antigens erkennen. In einem Screening werden die Hybridomazellen hinsichtlich ihrer Eigenschaft, selektiv ein Antigen zu binden, untersucht. Anschließend werden die gewünschten Zellen in Zellkulturen oder in Wirtstieren gezüchtet. Diese Methode ist verglichen mit der Herstellung polyklonaler Antikörper zwar aufwändiger, bietet dennoch große Vorteile. Da sich die Hybridomazellen einfrieren sowie auftauen lassen, ist die weitere Produktion spezifischer monoklonaler Antikörper mit gleichbleibender Qualität gewährleistet. Zudem ist die Wahrscheinlichkeit von Kreuzreaktivitäten minimiert, da nur ein Epitop des Antigens erkannt wird.

Aufgrund ihrer hohen Toxizität können keine nativen Biotoxine zur Immunisierung verwendet werden. Um eine genügend hohe Konzentration an Antikörpern im Serum zu erhalten, werden hohe Antigenkonzentrationen benötigt, die jedoch zum Tod des Versuchstieres führen würden. Folglich wurden verschiedene Strategien zur Immunisierung mit dem Ziel entwickelt, die Toxizität abzuschwächen und gleichzeitig die für die Immunisierung notwendige dreidimensionale Struktur der Epitope zu erhalten. Eine Möglichkeit hierzu bildet die Verwendung von Toxoiden, welche Formalin-inaktivierte Biotoxine mit bestehender antigener Wirkung darstellen [94]. Weiterhin können hochmolekulare Biotoxine mit Tosyl-aktiven Dynabeads gekoppelt werden. Diese Kopplung führt zu einer Minderung der Toxizität um einen Faktor von etwa 116 bei Rizin [95]. Ist das Biotoxin aus mehreren Toxin-Subketten aufgebaut, besteht die Möglichkeit das Biotoxin in nicht-toxische Subketten zu spalten und die isolierten Proteinteile zur Immunisierung zu verwenden. Nach erfolgreicher Immunisierung mit der B-Kette von Rizin waren die Versuchstiere im anschließendem Test auch bei hohen Mengen an Rizin geschützt [96]. Da die Toxizität von SEB geringer ist (siehe Tabelle 1.1), kann das rekombinante SEB direkt zur Immunisierung eingesetzt werden [95].

Wie bereits erwähnt, erkennt das Immunsystem Antigene ab einer Größe von 5 - 10 kDa. Somit würde es bei den marinen Toxinen, deren Molekulargewicht zwischen 0,3 - 0,8 kDa liegt, zu keiner Bildung von Antikörper kommen. Um eine Immunantwort für Antigene mit einer geringeren molaren Masse auszulösen, werden diese an Trägerproteine gebunden [97].

2.2.4 Anti-idiotypische Antikörper

Wie oben angesprochen reagiert das Immunsystem auf Antigene (Ag) mit der Produktion von Antikörpern (Ak_1). Dabei ist die Antigenbindungsstelle (Paratop) des Antikörpers strukturell komplementär zu einem Epitop des Antigens. Die neu gebildeten Strukturen der Antigenbindungsstelle wirken für das Immunsystem wie fremde Strukturen, so dass diese vom Immunsystem wie Antigene behandelt werden. Es kommt zur Bildung weiterer Antikörper (Ak_2), den anti-Idiotypen bzw. anti-idiotypischen Antikörper, die gegen diese Antigen determinante gerichtet sind und damit direkt an die Antigenbindungsstelle des Antikörpers (Ak_1) binden. Die einzigartige Struktur der Antigenbindungsstelle des Antikörpers (Ak_1) wird zudem als Idiotyp bezeichnet [98].

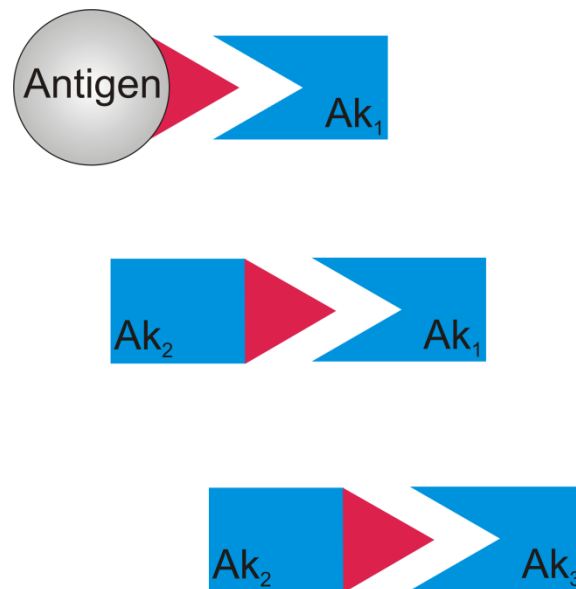


Abbildung 2.13: Idiotypische Netzwerktheorie [99].

Die Antikörper (Ak_2) werden ihrerseits zu Antigenen für das Immunsystem und induzieren die Produktion weiterer anti-anti-idiotypischer Antikörper (Ak_3), die Ähnlichkeiten zu dem ursprünglich produzierten Antikörper (Ak_1) aufweisen. Dieser Ablauf ist bekannt unter der Bezeichnung idiotypische Netzwerktheorie (Abbildung 2.13) [99], wobei die anti-idiotypischen Antikörper zur Regulation des Immunsystems beitragen [98]. Die Regulation erfolgt über Stimulations- und Suppressionsmechanismen mit dem Ziel ein Gleichgewicht an Antikörpern mit bestimmten Idiotypen zu schaffen.

Die anti-idiotypischen Antikörper bzw. Antikörper (Ak_2) werden in drei unterschiedliche Gruppen $Ak2\alpha$, $Ak2\beta$ und $Ak2\gamma$ eingeteilt [100], wobei die Antikörper $Ak2\alpha$ -Strukturen in den variablen Regionen des Antikörpers erkennen, die nicht direkt mit der Antigenbindungsstelle

in Verbindung stehen (Abbildung 2.14). Die Antikörper Ak2 β imitieren hingegen genau die Struktur des Antigens, da diese die Epitope der Antigenbindungsstelle erkennen. Somit präsentiert Ak2 β ein Abbild des ursprünglichen Antigenepitops. Auch die Antikörper Ak2 γ erkennen das Epitop der Antigenbindungsstelle, ähneln jedoch nicht der Struktur des ursprünglichen Antigens.

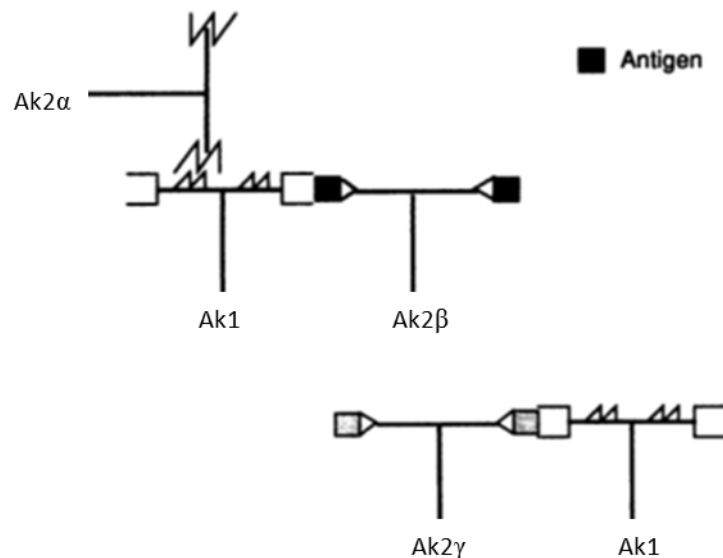


Abbildung 2.14: Unterteilung der anti-idiotypischen Antikörper anhand der verschiedenen Gruppen Ak2 α , Ak2 β und Ak2 γ [100].

Bei der Entwicklung aktiver Impfstoffe stellen die Antikörper Ak2 β die wichtigste Gruppe dar, da diese mit ihrem Paratop das Epitop des Antigens strukturell nachahmen. Antigene, die hoch infektiös, toxisch oder schwierig zu isolieren sind, können durch anti-idiotypische Antikörper ersetzt werden. Die anti-idiotypische Antikörper gelten dabei als sichere Immungene [101, 102].

In der Diagnostik können anti-idiotypische Antikörper anstatt der Analytmoleküle eingesetzt werden, wenn diese teuer oder schwer zu beschaffen sind. Durch den Einsatz von anti-idiotypische Antikörpern wird das Arbeiten mit toxischen Substanzen minimiert. Zudem bieten anti-idiotypische Antikörper eine mögliche Alternative, falls ein Toxin nicht in den benötigten Mengen zur Verfügung steht oder eine Immobilisierung der Analytmoleküle aufgrund geringer Löslichkeit oder Mangel an funktionellen Gruppen an verschiedene Trägermaterialien nicht durchzuführen ist [103].

2.3 Analytik von Phycotoxinen

In diesem Kapitel wird ein Überblick über die derzeitigen Detektionsmöglichkeiten von Phycotoxinen gegeben. Generell lassen sich die Nachweissysteme in biologische, bioanalytische und analytische Verfahren einteilen. Die biologischen Verfahren basieren auf diagnostischen Tierversuchen hauptsächlich mit Mäusen oder Ratten. Unter den bioanalytischen Methoden versteht man funktionelle Assays wie Zellkultur-basierte Assays und Ligand-Rezeptor-Bindungstests, die auf der biologischen Aktivität der Toxine beruhen sowie alle Testsysteme, die auf immunologischen Prinzipien basieren. Zu den analytischen Verfahren zählen chemisch-physikalische Methoden wie elektrophoretische, spektrophotometrische und chromatographische Analyseverfahren, wobei die chromatographischen Verfahren die größte Bedeutung bei der Identifizierung und Quantifizierung besitzen [104, 105].

2.3.1 Mausbioassay als biologisches Nachweisverfahren

Für die Überwachung der Grenzwerte für Phycotoxine erlaubt die EU-Vorschrift [EG 2074/2005] die Verwendung von Tierversuchen. Als Standardmethode gilt dabei der Mausbioassay, der in der Detektion von DA, OA und STX Anwendung findet [106].

Die Probenvorbereitung für DA und STX ist dabei identisch und erfolgt nach der *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* zertifizierten Methode [107]. Der Tod der Tiere gilt dabei als positives Ergebnis, wobei die Menge an Saxitoxin, die eine 20 g schwere, männliche Maus innerhalb von 7 min nach intraperitonealer Injektion tötet [54], als eine Mauseinheit (1 MU, *mouse unit*) bezeichnet wird. Für einen DA-Nachweis muss die Beobachtungszeit der Mäuse auf 15 min bis zu 4 h verlängert werden, wobei sich bei Mäusen die Symptome einer ASP-Vergiftung deutlich von denen einer PSP-Vergiftung unterscheiden [108]. Tritt innerhalb von 15 min der Tod der Mäuse ein, so liegt die DA-Konzentration über dem festgesetzten Grenzwert von 20 mg/kg in Muschelfleisch.

Im Gegensatz zu den hydrophilen Verbindungen STX und DA handelt es sich bei OA um ein lipophiles Molekül, weshalb für die Extraktion der DSP-Toxine organische Lösungsmittel eingesetzt werden [109]. Sterben die Mäuse innerhalb der ersten 5 h, werden die Muschelproben als positiv angesehen und für den Menschen als gefährlich eingestuft. In den letzten Jahren sind jedoch zahlreiche Fälle aufgetreten, die belegen, dass der Mausbioassay bei der Bestimmung der DSP-Toxine zu falschen Ergebnissen führte [110]. Dies wurde in der

EU Verordnung [EG 2074/2005] berücksichtigt, so dass neben den biologischen auch chemisch-physikalische Methoden für den Nachweis dieser Toxine angewandt werden können [106].

Fazit

Mit dem Mausbioassay wird die Gesamtoxizität einer Muschelprobe wiedergegeben, die eine wichtige Information für die Beurteilung des Gefährdungspotenzials einer Muschelprobe ist, wodurch dieser Test immer noch Anwendung findet. Je nach Art der beobachteten Symptome bei den Mäusen ist ein Rückschluss auf die Toxinfamilie in der kontaminierten Probe möglich. Es können aber weder quantitative Aussagen über den Toxingehalt getroffen werden, noch erlaubt der Mausbioassay eine Spezifizierung der Toxin-Analoga. Der Mausbioassay ist aus tierschutzrechtlichen Gründen bedenklich, da sehr viele Tiere leiden müssen. Zudem weist dieser Test eine schlechte Sensitivität, schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und hohe Nachweisgrenzen auf und ist nicht validierbar [104, 111].

2.3.2 Analytische Methoden

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von chromatographischen Methoden zur Spezifizierung und Quantifizierung von Phycotoxinen sowie zur Identifizierung neuer Analoga entwickelt. Die Auftrennung einer Mischung in die einzelnen Substanzen erfolgt hauptsächlich über Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC, LC), wobei die Trennung in einem Flüssigkeitsstrom, der über eine stationäre Phase geleitet wird, erreicht wird. Die Detektion erfolgt über Fluoreszenz (FL), UV-Absorption oder Massenspektrometrie (MS, Tandem-MS). Einen Überblick über die verschiedenen existierenden chromatographischen Methoden zur Detektion von Phycotoxinen gibt *Quilliam* [112]. Für jedes Phycotoxin werden im Folgenden ausgewählte chromatographische Methoden mit ihren Nachweisgrenzen vorgestellt.

Die Stärke der chromatographischen Methoden liegt in der Spezifizierung und Quantifizierung geringer Rückstandsmengen. Zudem lässt sich die individuelle Zusammensetzung der einzelnen Phycotoxine in einer Probe bestimmen. Dieser Vorteil ist dennoch zugleich ein Nachteil, da sich die Bestimmung der Phycotoxine und ihrer Analoga auf jeweils eine Toxinfamilie beschränkt. Eine Toxinfamilien-übergreifende Quantifizierung wurde aufgrund der stark unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften bis jetzt noch nicht in der Literatur beschrieben. Im Folgenden wird deswegen auf jede Toxinfamilie separat eingegangen.

Domoinsäure (ASP-Toxine)

Bei der Detektion von Domoinsäure wird die strukturelle Eigenschaft genutzt, dass DA ein Dien-Chromophor besitzt, welches eine starke Absorption bei 242 nm zeigt. Die ersten entwickelten Methoden basierten somit hauptsächlich auf der Flüssigkeits-Chromatographie mit UV-Detektion (LC-UV) [112], wobei die Nachweisgrenzen im Bereich von 1 - 80 µg/L lagen [108]. Durch die Umsetzung von DA mit 9-Fluormethylchloroformiat (FMOC-Cl) in eine fluoreszierende Substanz konnte die Detektion mittels Flüssigkeits-Chromatographie gekoppelter Fluoreszenz-Detektion (LC-FL) durchgeführt werden [113]. Die Nachweisgrenze lag bei 0,5 µg/L bei isokratischer Eluierung und konnte auf 15 ng/L bei Gradienteneluierung gesenkt werden. Vergleichbare Nachweisgrenzen erhielten *Mafrá et al.* durch die Verbesserung ihres LC-Systems, welches mit UV- oder MS-Detektion kombinierbar ist, wodurch sie Nachweisgrenzen für DA von 42 ng/L für LC-UVD und 15 ng/L für LC-MS in Meerwasser und Plankton erhielten [114]. *Lawrence et al.* erreichten eine Nachweisgrenze von 1 mg/kg DA in Muschelfleisch mit HPLC-UV. Dieses Verfahren wurde von *Quilliam et al.* hinsichtlich niedrigerer Nachweisgrenzen von 20 – 30 µg/kg verbessert und gilt von der AOAC als Standardmethode [20, 108, 115].

Okadasäure (DSP-Toxine)

Eine Methode, um die DSP-Toxine zu bestimmen, stellt die HPLC-UV dar. Hierzu werden zunächst OA und seine Analoga in einer Vorsäulen-Derivatisierung mittels 9-Anthryldiazomethan (ADAM), welches selektiv mit Säuregruppen reagiert, zu stark fluoreszierenden Estern umgesetzt [116]. Mit dieser Methode konnte eine Nachweisgrenze von 0,4 mg/kg OA in Muschelfleisch erreicht werden. Jedoch führte die Notwendigkeit weiterer Reinigungsschritte nach der Derivatisierung und die Instabilität des Reagenzes ADAM zur Entwicklung weiterer Detektionssysteme. Durch die Verwendung von Flüssigkeitschromatographie-gekoppelter Massenspektrometrie (LC-MS) konnte die Nachweisgrenze auf 5 – 40 µg/kg DSP-Toxine in Muschelfleisch gesenkt werden [117]. Eine Kombination der LC-MS mit Elektrospray-Ionisation ermöglichte die selektive Trennung von OA und seinen Analoga [118]. Bedingt durch ihre chemische Struktur müssen jedoch beide Ionisationsmodi verwendet werden, da sich einige Toxine nur im positiven oder negativen Modus gut ionisieren lassen. Um die für eine Bestimmung der DSP-Toxine notwendige freie Säuregruppe zu erhalten, ist eine alkalische Hydrolyse erforderlich. Die damit verbundenen hohen Salzkonzentrationen können neben Matrixeffekten zu einer Signalunterdrückung in der Ionisationsquelle führen. Demzufolge wurde der LC-MS/MS eine on-line

Festphasenextraktion vorgeschaltet, die eine Entsalzung der hydrolysierten Muschelproben erlaubt, Matrixeffekte minimiert und eine Nachweisgrenze von 2,75 µg/kg OA Muschelfleisch erreicht [119].

Saxitoxin (PSP-Toxine)

Die Schwierigkeit in der Trennung der PSP-Toxine liegt in ihrer hohen Polarität und der Instabilität der fluoreszierenden Derivate. Die PSP-Toxine besitzen für eine UV- oder Fluoreszenzdetektion kein geeignetes Chromophor, so dass eine Umsetzung aller PSP-Toxine in fluoreszenzaktive Substanzen notwendig ist. Die erste chromatographische Methode (HPLC-FL) für die Detektion von Saxitoxin basierte auf alkalischer Oxidation mit Wasserstoffperoxid, die über mehrere Schritte STX in ein fluoreszierendes Produkt umwandelte [120]. Die Nachteile dieser Methoden lagen in der komplizierten und aufwendigen Herstellung. Zudem bildeten die PSP-Toxine mehrere Oxidationsprodukte. Gegenüber dieser Methode haben sich die Vorsäulen- bzw. Nachsäulen-Derivatisierung durchgesetzt, um die PSP-Toxine in fluoreszenzaktive Substanzen zu überführen. Eine der wichtigsten Methoden der Nachsäulen-Derivatisierung wurde von *Oshima et al.* [121, 122] beschrieben. Die PSP-Toxine werden dabei durch die Verwendung verschiedener Ionenpaarbildner in drei separaten isokratischen Läufen voneinander getrennt. Die Trennung aller PSP-Toxine wird gruppenweise (Gruppe I: C1-C4; Gruppe II: GTX1-4, B1 und B2, dc-GTX1-4; Gruppe III: NEO, dc-STX, STX) anhand ihrer Basenstärke erreicht [123]. Da jede Probe dreimal gemessen werden muss, ist diese Methoden sehr zeit- und kostenintensiv und eignet sich nicht für eine schnelle Routineanalytik [124]. Eine alternative Methode, die neben dem Mausbioassay von der AOAC akzeptiert wurde, ist die Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie mit Vorsäulen-Derivatisierung nach *Lawrence* [125, 126]. Durch die Vorsäulen-Derivatisierung mit Wasserstoffperoxid konnte die Sensitivität für nicht hydroxylierte und mit Periodsäure hydroxylierte PSP-Toxine gesteigert werden. Der Zusatz von Ammoniumformiat bei der Oxidation mittels Periodsäure erhöhte zusätzlich die Fluoreszenzausbeuten [125]. Mit dieser Methode können Konzentrationen im Bereich von 3 – 6 µg pro Kilogramm Muschelfleisch für nicht hydroxylierte und 7 – 12 µg für hydroxylierte Analoga bestimmt werden. Jedoch können bei dieser Methode für ein Toxin mehrere Reaktionsprodukte entstehen, so dass eine Bestimmung der Gesamtoxizität der Probe nicht möglich ist. Zur Trennung der PSP-Toxine wurden weitere Systeme entwickelt, die auf einer massenspektrometrischen Bestimmung der PSP-Toxine basieren. Zu nennen sind hier vor allem Ionenaustauscher-Säulen [127] und die hydrophile Interaktionschromatographie (hydrophilic interaction chromatography, HILIC) [128], die eine sensitive

und selektive Trennung aller PSP-Toxine aus Plankton in einem Lauf ermöglicht. Die anschließende Tandem-MS-Detektion führt zu vergleichbaren Nachweisgrenzen wie die Fluoreszenz-Detektion [112].

Fazit

Trotz der Vorteile wie die selektive Identifizierung und sensitive Quantifizierung der Phycotoxine und ihrer Analoga, eignen sich chromatographische Methoden nicht für eine schnelle Routineanalytik bzw. ein Monitoring, da diese eine zeit- und laborintensive Probenvorbereitung benötigen. Weitere Nachteile sind die hohen Kosten verbunden mit der Anschaffung, Instandhaltung und Betrieb der chromatographischen Systeme. Für die Analysen werden hochqualifiziertes Personal und zertifizierte Standards benötigt [129]. Um die Gesamttoxizität einer Muschelprobe zu bestimmen, ist eine Umrechnung der detektierten Analoga in Toxizitäts-Äquivalente erforderlich [124]. Die Berechnung erfolgt mittels Umrechnungsfaktoren, welche auf dem Mausbioassay basieren. Die in der Literatur beschriebenen Werte weisen große Unterschiede auf [130], die die Bestimmung der tatsächlichen Toxizität erschweren.

2.3.3 Funktionelle Assays

Funktionelle Assays basieren auf der biologischen Aktivität von Toxinen. Dabei wird die spezifische Bindung der Toxine an einen bestimmten Liganden oder an Zellen betrachtet [131]. Die Bindung kann auf einer Blockade oder Stimulation der Liganden bzw. Zellen basieren, wodurch eine detektierbare biologische Antwort induziert wird. Da sich die Detektion auf den speziellen Wirkmechanismus jedes einzelnen Phycotoxins bezieht, ist wie bei den physikalisch-chemischen Methoden keine Toxinfamilien-übergreifende Analyse möglich.

2.3.3.1 Zell-basierte Assays

Okadasäure (DSP-Toxine)

Um Toxine mittels Zell-basierten Assays zu bestimmen, sind lebende Zellen eine wichtige Voraussetzung, da der Nachweis der Toxizität auf der Überlebens- oder Funktionsfähigkeit der Zellen beruht. Für den Nachweis von DSP-Toxinen werden die Veränderungen bezüglich der Morphologie der kultivierten Zellen beobachtet, da Okadasäure und die zugehörigen Analoga Auswirkungen auf das Zytoskelett haben [131]. Anhand von KB-Zellen kann die Zytotoxizität von den DSP-Toxinen mikroskopisch [132] und spektrophotometrisch [133]

nachgewiesen werden. Die letztere Methode basiert auf der Fähigkeit von metabolisch aktiven Zellen, den gelben Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu einem blauen Produkt, dem Formazan umzusetzen [133]. Diese Methode erlaubt die Bestimmung von OA mit einer Nachweisgrenze von 50 µg/kg OA in Muschelfleisch. *Flanagan et al.* übertrugen die MTT-basierte Detektion von DSP-Toxinen auf andere Zelllinien und konnten neben den DSP-Toxinen parallel die AZP-Toxine nachweisen [134]. In Neuroblastom-Zellen verursachen die DSP-Toxine eine Depolymerisierung von Aktinfilamenten, welche über Fluoreszenz mit einer Nachweisgrenze von 0,2 – 1,0 mg/kg OA in Muschelfleisch detektiert werden können [135].

Saxitoxin (PSP-Toxine)

Da Saxitoxin effektiv Natriumionenkanäle blockiert, werden für den Nachweis dieses Neurotoxins Neuroblastom-Zellen verwendet. Diese weisen eine erhöhte Anzahl von Na-Kanälen in ihren Zellwänden auf. Um die Spezifität des Assays zu erhöhen, werden Veratridin und g-Strophanthin zu den Zellkulturen zugegeben. Saxitoxin blockiert durch seine Bindung die Natriumionenkanäle und unterdrückt als Folge den durch Veratridin/g-Strophanthin induzierten Zelltod, was zum Überleben der Neuroblastom-Zellen führt. Der Effekt bzw. das Toxizitätspotenzial von Saxitoxin auf diese Zellen lässt sich mikroskopisch [136] oder spektrophotometrisch [137, 138] detektieren, wobei Nachweisgrenzen im Bereich von 1 ng STX erreicht wurden. Die Zugabe von Maitotoxin zu Veratridin und g-Strophanthin führte zu einer deutlich verkürzten Assay-Dauer mit einer niedrigeren Nachweisgrenze von 0,14 ng STX [139]. Ein weiterer Ansatz für einen schnellen funktionellen Assay basiert auf der Veränderung des Membranpotentials von Neuroblastom-Zellen. Hierbei wird die vom Membranpotential abhängige Aufnahme des Farbstoffes Bis-Oxonol durch den Zusatz von Veratridin erhöht. Bei Zugabe von PSP-Toxinen kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Inhibierung dieser Aufnahme, die über Fluoreszenz mit einer Nachweisgrenze von unter 1 µg/L STX in Muschelfleisch gemessen wird [140].

2.3.3.2 Ligand/Rezeptor-Bindungsassays

Domainsäure (ASP-Toxine)

Die spezifische Bindung von Domainsäure an Glutamatrezeptoren führte zur Entwicklung eines funktionellen Assays für ASP-Toxine. Der Nachweis basiert dabei auf einer Konkurrenzreaktion von Domainsäure mit radioaktiv markierter Kainsäure um die Bindungsstellen der Glutamatrezeptoren [141]. Um die Nachweisgrenze und die Selektivität des Verfahrens zu verbessern, muss zunächst bei der Probenvorbereitung mit Hilfe des

Enzyms Glutamatdecarboxylase das endogen vorkommende Glutamat im Muschelfleisch entfernt werden.

Okadasäure (DSP-Toxine)

Aufgrund des speziellen Wirkmechanismus der DSP-Toxine, die Protein-Phosphatasen (PP) zu hemmen, wurden sehr spezifische Protein-Phosphatasen-Assays hauptsächlich mit dem Typ 2A entwickelt. Um die DSP-Toxine zu detektieren, nutzt man dabei die Fähigkeit von PP2A, p-Nitrophenylphosphat zu farbigen p-Nitrophenyl zu dephosphorylieren. Die Detektion erfolgt spektrophotometrisch mit einer Nachweisgrenze von 1 µg/kg [142] oder fluorimetrisch mit einer Nachweisgrenze von 13 µg/kg OA in Muschelfleisch [143]. Um alle Analoga erfassen zu können, ist eine Hydrolyse der Muschelproben erforderlich, da veresterte DSP-Toxine keinen Effekt auf die PP2A zeigen [144].

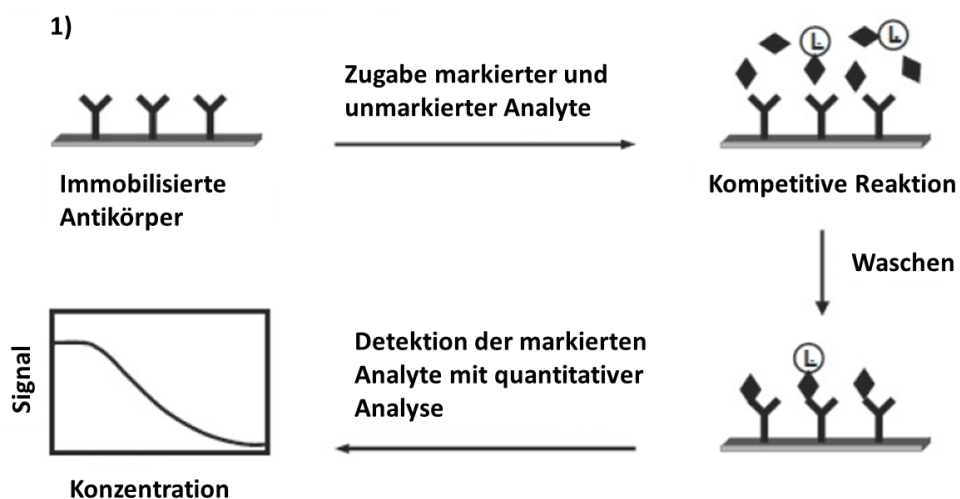
Fazit

Funktionelle Assays ermöglichen eine Bestimmung der Gesamtoxizität bezogen auf die jeweilige Toxinfamilie. Strukturell ähnliche Phycotoxine aus einer Familie, die keine biologische Aktivität besitzen, werden für die Bestimmung der Toxizität nicht erfasst. Die Nachteile der funktionellen Assays liegen im Umgang mit lebenden Zellen und in der Dauer (6 – 72 h, inklusive der Inkubationszeiten von Zellen und Liganden mit den Phycotoxinen), wodurch diese Verfahren keinen Einzug in die Routineanalytik gefunden haben. Funktionelle Assays könnten jedoch den Mausbioassay für die Berechnung der Toxin-Äquivalenten ersetzen.

2.3.4 Immunologische Verfahren

Die routinemäßige Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen jedes beliebige Antigen in unbegrenzter Menge ermöglichte die Entwicklung hochpräziser, schneller und einfach anwendbarer Testsysteme, den Immunoassays. Man unterscheidet dabei zwischen homogenen und heterogenen Immunoassays [145]. Während bei den homogenen Immunoassays die Antigen-Antikörper-Reaktion in einer homogenen Phase verläuft, ist bei den heterogenen Immunoassays eine Phasentrennung notwendig. Antikörper oder Antigene werden adsorptiv oder kovalent auf der Oberfläche eines Trägers oder Partikels immobilisiert, wobei die Phasentrennung über Waschschriffe erfolgt. Als Festphasen kommen Kunststoff, Metall oder Glas zum Einsatz. Eine weitere Unterteilung der heterogenen Immunoassays erfolgt in kompetitive und nicht kompetitive Immunoassays [146]. Nicht kompetitive Immunoassays

sind in Kapitel 2.4.2 beschrieben. Bei den Phycotoxinen handelt es sich um niedrigmolekulare Substanzen, die nur eine Antikörperbindestelle zur Verfügung haben, so dass deren Detektion ausschließlich im kompetitiven Format durchgeführt wird. Hierbei kann zwischen direkt und indirekt kompetitiven Testformaten unterschieden werden. Die Unterscheidung direkt oder indirekt bezieht sich dabei auf das Markierungselement und somit wie die Bindung erfasst wird [147]. Ist der Marker direkt an den Detektionsantikörper gebunden oder wird ein Marker-gekoppelter Analyt verwendet, so spricht man von einem direkt kompetitiven Immunoassay. Hingegen wird beim indirekt kompetitiven Immunoassay ein Marker-gekoppelter sekundärer Antikörper genutzt, um den primären Detektions-antikörper zu markieren [148, 149]. Im Vergleich zum indirekten Testformat, bei dem nur das Antigen auf der Oberfläche des Trägers gebunden wird, kann beim direkten Testformat sowohl der Antikörper als auch das Antigen immobilisiert sein. In Abbildung 2.15 ist der schematische Ablauf von direkt kompetitiven Immunoassays dargestellt.



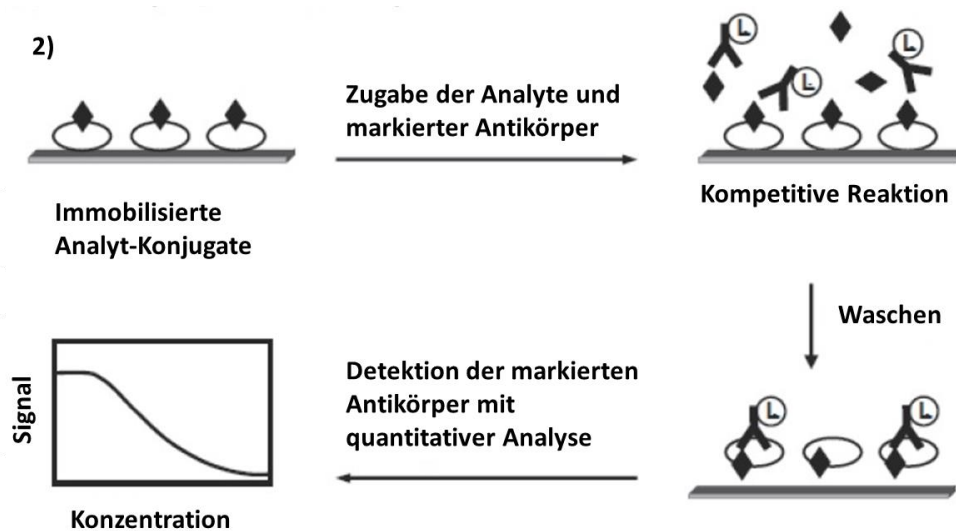


Abbildung 2.15: Varianten des direkt kompetitiven Immunoassays [150].

Bei diesen Testformaten konkurrieren freie Analyte mit einer konstanten Menge an freien, markierten Antigenen oder mit festphasengebundenen Antigenen um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindestellen. Je höher die Analytkonzentration ist, desto weniger markierte Antigene binden an die immobilisierten Antikörper bzw. desto weniger Detektionsantikörper binden an die immobilisierten Antigene. Dabei ergibt sich ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen dem Signal und der eingesetzten Analytkonzentration, welcher anhand der sigmoidalen Kurvenverläufe schematisch dargestellt ist.

Über die Markierung der Antigene bzw. Antikörper kann die selektive Antigen-Antikörper-Bindung ausgelesen werden. Als Marker werden radioaktive Isotope (Radio-Immunoassays, RIA), Enzyme (Enzym-Immunoassays, EIA), Fluoreszenz-(Fluoreszenz-Immunoassays, FIA) und Chemilumineszenz-Marker (Chemilumineszenz-Immunoassay, CLIA) oder Marker für eine elektrochemische Detektion eingesetzt [151]. Zu den am häufigsten verwendeten Enzymen zählen alkalische Phosphatase (AP), β -Galactosidase (β Gal) und Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) [152], wobei sich HRP durch einen hohen Substratumsatz auszeichnet. Zur Steigerung der Empfindlichkeit kann an die Detektionsantikörper Biotin gebunden werden, welches mit HRP-gebundenem Streptavidin (SA-HRP) wechselwirkt. Es handelt sich dabei um eine der stärksten nicht kovalenten Bindungen mit einer Bindungskonstante von $\sim 10^{-15}$ M [153]. Eine weitere Amplifizierung des Signals kann durch die Verwendung von SA-PolyHRP40 (Abbildung 2.16) erfolgen, da im Vergleich zu SA-HRP in diesem Komplex mehrere HRP-Moleküle vorhanden sind [154].

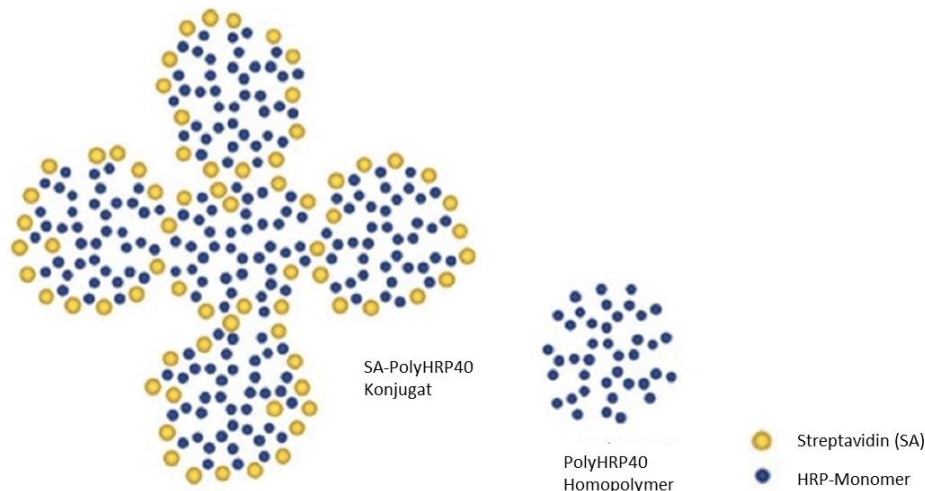


Abbildung 2.16: SA-PolyHRP40 [155].

Weiterhin besteht die Möglichkeit die selektive Antigen-Antikörper-Bindung markierungsfrei zu detektieren und zu quantifizieren. Dies kann über Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface plasmon resonance*, SPR) oder Quarzkristall-Mikrowaagen (*Quartz-crystal microbalance*, QCM) erfolgen [151], wobei bei beiden Methoden die Erhöhung der Masse auf der Oberfläche eines *Transducers*, auf der ein Reaktionspartner immobilisiert ist, gemessen wird.

2.3.4.1 Einzelnachweisverfahren

ELISA Testsysteme

Das am weitesten verbreitete Format, welches auf der Affinitätsbindung zwischen Antikörper und Antigen basiert, ist der ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Dieser zeichnet sich durch einen schnellen, sensitiven und genauen Nachweis von vielen Analyten aus. Verschiedene ELISAs wurden bereits für die Phycotoxine Domoinsäure [156] mit einer Nachweisgrenze von 0,75 µg/L (25 µg/kg), Okadasäure [157] mit 0,5 – 1,7 µg/L und Saxitoxin [158, 159] mit 0,2 µg/kg ($IC_{50} = 0,3 \mu\text{g/L}$) entwickelt. Wegen der einfachen Anwendbarkeit und der geringen Kosten von ELISA - Testsystemen wurden einige kommerziell erhältliche Test-Kits entwickelt. Beispielsweise gibt es von der Firma Abraxis [160] ELISA Kits für den Nachweis von DA, OA und STX, wobei die Phycotoxine in einem Bereich von 0,01 – 0,3 µg/L für DA, 0,2 – 5 µg/L für OA und 0,02 – 0,4 µg/L für STX detektierbar sind. Ein weiterer ELISA-Test für PSP-Toxine ist von der Firma R-Biopharm unter der Bezeichnung RIDASCREEN®FAST PSP SC erhältlich [161]. Dabei wird für Saxitoxin eine Nachweisgrenze von 50 µg/L angegeben, die verglichen mit der Nachweisgrenze von 0,02 µg/L für STX im Abraxis Test, um den Faktor 2500 höher ist. Von der Firma UBE Industries wurde ein Test-Kit namens DSP-Check® für die Detektion von OA

entwickelt, welcher weltweit für den Nachweis von OA und DTX1 zum Einsatz kam [162]. Für diesen Test wurde eine Nachweisgrenze von 100 µg/kg beschrieben [163]. Ein weiterer Test-Kit für DSP-Toxine ist der Rougier Bio-Tech® ELISA [164]. Bei diesem Test-Kit wird zum Nachweis von OA ein anti-idiotypischer Antikörper verwendet, der die Struktur von OA imitiert. Die Detektion von OA erfolgt dabei in einem Bereich von 9 – 81 µg/L. Ein direkter Vergleich beider Test-Kits für DSP-Toxine zeigte, dass mit beiden ELISA Tests sehr genaue Abschätzungen der Konzentration von Okadasäure in Muschelfleisch möglich sind [165]. Mit Assay-Zeiten von ca. 1 – 2,5 h handelt es sich bei allen ELISAs um schnelle Methoden zur Detektion der Phycotoxine, wobei die niedrigsten Nachweisgrenzen von der Firma Abraxis (Tabelle 2.5) angegeben werden.

Tabelle 2.5: Vergleich der ELISA Testsysteme.

Phycotoxin	Methode	LOD in Puffer [µg/L]	LOD in Matrix [µg/kg]	Literatur
DA	ELISA	0,75	25	[156]
DA	Abraxis Test Kit	0,01 – 0,3		[160]
OA	ELISA	0,5 – 1,7		[157]
OA	Abraxis Test Kit	0,2 – 5		[160]
OA	DSP-Check®		100	[162]
OA	Rougier Bio-Tech® ELISA	9 – 81		[164]
STX	ELISA		0,2	[158, 159]
STX	Abraxis Test Kit	0,02 – 0,4		[160]
STX	RIDASCREEN®FAST PSP SC	50		[161]

Biosensoren

Neben hoher Sensitivität und niedrigen Nachweisgrenzen werden Biosensoren im Vergleich zu ELISA Testsystemen weiteren Anforderungen wie einer hohen Miniaturisierung, einem hohen Grad an Automation und Transportfähigkeit gerecht. Durch Einsparungen von Reagenzien und dadurch, dass kein hochqualifiziertes Personal benötigt wird, ergeben sich geringere Kosten für Biosensoren. Ein hoher Probendurchsatz ermöglicht zudem den Einsatz für Routinekontrollen. Die für die Phycotoxine entwickelten Biosensoren basieren auf dem Prinzip eines kompetitiven Immunoassays, die den biologischen Teil des Immunosensors

darstellen. Komplettiert wird der Sensor durch eine *Transducer*-Komponente, die die biochemische Reaktion in auswertbare Signale umwandelt.

Eine Möglichkeit, biochemische Reaktionen zu detektieren, stellt die elektrochemische Detektion dar. Elektrochemische Verfahren beruhen auf dem Prinzip der Amperometrie, Voltammetrie, Potentiometrie oder Impedanz [166]. Über Elektroden werden die Eigenschaftsänderungen auf der jeweiligen Sensoroberfläche gemessen. Bei amperometrischen Biosensoren erfolgt die Messung über einen Elektrolysestrom, welcher zu der Konzentration der umgesetzten, elektroaktiven Substanz proportional ist [167]. Dabei liegt ein zeitlich konstantes Potential an den Elektroden an. Hingegen wird bei der Voltammetrie der Elektrolysestrom bei einer sich zeitlich ändernden Spannung gemessen. Eine weitere Abwandlung ist die Differenzpuls-Voltammetrie (DPV), bei der durch erzeugte Spannungsimpulse eine Stromänderung induziert wird. Potentiometrische Biosensoren messen die elektrischen Ladungen der, in einer enzymatisch katalysierten Reaktion entstehenden oxidierten bzw. reduzierten Produkte. Die Leitfähigkeit der Rezeptorschicht spielt hierbei eine wichtige Rolle [167]. Bei der Impedanz basieren die Messungen auf der Änderung des Wechselstromwiderstands. Im Vergleich zur freien Elektrode wird eine Impedanz-Zunahme auf den Analyt-bedeckten Elektroden gemessen, da sich aufgetragene Substanzen wie Isolatoren auswirken.

Für den Nachweis von STX wurde ein elektrochemischer Biosensor entwickelt, der dieses Phycotoxin innerhalb von 2 Stunden bis zu einer Konzentration von 2 mg/L detektieren kann [168]. Die Detektion erfolgt über Antikörper, die mit dem Enzym Glucose-Oxidase markiert sind. Nach Substratzugabe wird die Freisetzung von H₂O₂-Molekülen amperometrisch gemessen. Der von *Michaeli et al.* beschriebene elektrochemische Biosensor erreicht nach 150 min eine Nachweisgrenze von 5 µg/L für DA, wobei die Signalmessung auf Differenzpuls-Voltammetrie (DPV) beruht [169]. *Kreuzer et al.* entwickelten einen elektrochemischen Biosensor, der über einen amperometrischen Nachweis von p-Aminophenolphosphat, welches durch den Marker Alkalische Phosphatase produziert wird, Phycotoxine in 30 min detektiert [170]. Neben den Phycotoxinen Brevetoxin und Tetrodotoxin werden OA mit einer Nachweisgrenze von 1,5 µg/L und DA mit 2,0 µg/L nachgewiesen. Somit erreichten *Kreuzer et al.* eine niedrigere Nachweisgrenze für DA in einer kürzeren Zeit verglichen mit dem Detektionssystem von *Michaeli et al.*. Ebenfalls über einen amperometrischen Nachweis von p-Aminophenolphosphat erreichten *Campas et al.* [171] eine niedrigere Nachweisgrenze von 1,07 µg/L für OA. Durch den Zusatz des Enzyms Diaphorase wurde eine Amplifizierung des Signals erhalten und die Nachweisgrenze weiter

auf 0,03 µg/L gesenkt. In Muschelfleisch betrug die Nachweisgrenze 0,06 µg/kg. Die elektrochemische Detektion von OA mittels superparamagnetischen Beads und DPV führte zu Nachweisgrenzen von 0,38 µg/L innerhalb von 60 min [172]. Tabelle 2.6 stellt die elektrochemischen Biosensoren gegenüber.

Tabelle 2.6: Vergleich elektrochemischer Biosensoren zum Nachweis von Phycotoxinen.

Phycotoxin	Biosensor	LOD in Puffer [µg/L]	LOD in Matrix [µg/kg]	Assay- Dauer [min]	Literatur
DA	Amperometrisch (p-Aminophenol- phosphat)	2,0		30	[170]
DA	DPV	5		150	[169]
OA	Amperometrisch (p-Aminophenol- phosphat)	1,5		30	[170]
OA	Amperometrisch (p-Aminophenol- phosphat)	1,1 bzw. 0,03	0,06	420	[171]
OA	DPV	0,4		60	[172]
STX	Amperometrisch (H ₂ O ₂)	2000		120	[168]

Neben den elektrochemischen wurden auch markierungsfreie Immunosensoren entwickelt, die auf optische oder elektronische Änderungen oder auf Gewichtsveränderung der Sensoroberfläche reagieren. Ein Beispiel hierfür ist die Quarzkristall-Mikrowaage [173], die OA mit einer Nachweisgrenze von 3,6 µg/L in 80 min bestimmt. Jedoch basiert der markierungsfreie Nachweis der Phycotoxine hauptsächlich auf Oberflächenplasmonenresonanz (SPR). SPR-Biosensoren detektieren Massenänderungen in einem evaneszenten Feld über die Änderung des Brechungsindex. Die Sensoroberflächen bestehen aus einer Metallschicht und einer mit Molekülen wie Antikörpern oder Antigenen beschichteten Oberfläche. Dabei kommt es zur Totalreflexion von parallel polarisiertem Licht an der auf einem Prisma aufgetragenen Metallschicht. Die Oberflächenplasmonen der Metallschicht werden durch die einfallenden Photonen in kollektive Schwingung versetzt. Diese Anregung

zeigt sich als starke Absorption im reflektierten Licht. Bei Wechselwirkung der immobilisierten Rezeptoren mit deren Liganden, die eine optische Schichtdickenänderung zur Folge haben, kommt es zu einer Verschiebung der Resonanzwellenlänge der Oberflächenplasmonen, welche wiederum im reflektierten Licht detektiert werden [174, 175].

Von *Yu et al.* [176] wurde ein SPR-Biosensor für DA entwickelt. Hierzu wurde DA über Oberflächenfunktionalisierungen an selbstorganisierende Monoschichten (SAM, *self-assembled monolayers*) auf der SPR-Chip-Oberfläche kovalent gebunden. Die SAM-Oberfläche verhindert die unspezifische Adsorption von Antikörpern, so dass eine Nachweisgrenze von 0,1 µg/L für DA erreicht wurde. Zudem konnte der SPR-Chip erfolgreich im Basischen regeneriert werden. *Llamas et al.* [177] entwickelten einen regenerierbaren SPR-Chip für die Detektion von OA in Muschelfleisch, der OA bis zu einer Nachweisgrenze von 2 µg/L in Puffer bzw. 20 µg/kg in Muschelfleisch detektiert. Eine ähnliche Nachweisgrenze von 31 µg/kg OA in Muschelfleisch erhielten *Stewart et al.* [178], wobei deren System zusätzlich weitere OA-Analoga detektiert. Für die Detektion des Phycotoxins STX wurden regenerierbare SPR-Biosensoren entwickelt, die neben STX die meisten STX-Analoga detektieren können [179]. Je nach verwendeten Antikörpern liegen die Nachweisgrenzen für STX zwischen 0,2 – 2,9 µg/L [180, 181], bzw. 68 – 150 µg/kg in Muschelfleisch [182, 183]. In Tabelle 2.7 sind die erreichten Nachweisgrenzen zusammengefasst.

Tabelle 2.7: Vergleich SPR-basierter Biosensoren zum Nachweis von Phycotoxinen.

Phycotoxin	LOD in Puffer [µg/L]	LOD in Matrix [µg/kg]	Assay-Dauer [min]	Literatur
DA	0,1		60	[176]
OA	2	20	6	[177]
OA		31		[178]
STX	0,2 – 2,9		6 – 20	[179-181]
STX		68 – 150	5 – 8	[182, 183]

In der Literatur sind wenige Biosensoren beschrieben, die die Phycotoxine über Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-Markierung detektieren. Für eine Detektion mittels Fluoreszenz wird

ein Fluoreszenz-markierter Analyt bzw. Antikörper benötigt, der mittels Laser angeregt wird. Das Licht des Lasers wird von den fluoreszierenden Molekülen absorbiert. Diese werden auf einen elektronisch angeregten Zustand angehoben, fallen aber spontan in niedrigere Energiezustände zurück, wobei längerwelliges Licht emittiert wird [184]. Als Fluorophore können verschiedene fluoreszierende Farbstoffe [184], *quantum dots* [185] oder fluoreszierende Nanopartikel [186] eingesetzt werden.

Zu nennen ist hier ein Biosensor, der über Fluoreszenz-markierte Antikörper einen Testmittelpunkt von 17 µg/L für DA erreicht [187]. Ein weiterer Biosensor nutzt die Verstärkung des Fluoreszenzsignals über planare Wellenleiter und erreicht somit eine Nachweisgrenze von 12 ng/L für STX [188].

Im Vergleich zur Fluoreszenz wird bei der Chemilumineszenz keine externe Lichtquelle benötigt. Es entstehen keine Streueffekte des Lichtes, wodurch Hintergrundsignale minimiert sind. Auch zeigen komplexe Matrices wenig Einfluss auf die Signalmessung. Die Chemilumineszenz entsteht durch eine chemische Reaktion, bei der als Folge elektromagnetische Strahlung ausgesandt wird. Ein Beispiel dafür ist die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Luminol, welche durch das Enzym Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird. Als Folge dieser Reaktion wird Licht emittiert (Abbildung 2.17). Diese Lichtemission wird mit einer Charge-Coupled Device (CCD) Kamera aufgenommen, welche geringe Lichtintensitäten erfasst.

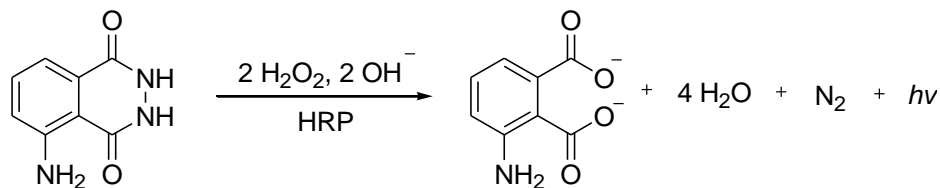


Abbildung 2.17: Chemilumineszenzreaktion von Luminol und Peroxid in Anwesenheit von HRP [189].

Neben Wasserstoffperoxid können als Oxidationsmittel auch Permanganate und Hypochlorite eingesetzt werden. Weitere Katalysatoren sind neben Enzymen Metallionen, Eisencyanid oder Metallkomplexe. [190]

Von *Marquette et al.* [191] wurde ein semi-automatischer Immunosensor vorgestellt, der in ein Fließinjektionssystem integriert ist. Aufgrund der Kombination mit der hochsensitiven Chemilumineszenz-Detektion konnte OA mit einer Nachweisgrenze von 2 µg/kg in Muschelfleisch innerhalb von 20 min detektiert werden. Für den Nachweis von STX wurde

ein automatisches mikrofluidisches System in der Größe eines Penny-Geldstückes beschrieben, das eine Nachweisgrenze von 0,02 µg/L in 30 min über Fluoreszenz erreicht [129].

Fazit

Neben den beschriebenen immunologischen Verfahren sind zahlreiche weitere immunologische Methoden zur Detektion der Phycotoxine in Review-Artikeln [30, 192, 193] zusammengefasst. Die angegebenen Nachweisgrenzen liegen dabei grundsätzlich im unteren µg/L-Bereich. Für wenige dieser Systeme ist auch eine Nachweisgrenze in Muschelfleisch angegeben. Die kürzesten Analysezeiten werden mit SPR-Biosensoren beschrieben, bei denen es sich zudem um regenerierbare Systeme handelt.

2.3.4.2 Multiplexnachweisverfahren

Die bisher beschriebenen immunologischen Testmethoden fokussieren ihren quantitativen Nachweis auf ein bestimmtes Phycotoxin oder die zugehörigen Analoga dieser Toxinfamilie. Wünschenswert sind jedoch Testsysteme, die alle Phycotoxine parallel detektieren können. Zum einen können mehrere verschiedene Phycotoxine in einer Probe vorkommen und zum anderen bietet die Anwendung eines Testsystems bezüglich aller Phycotoxine einen hohen Informationsgehalt bei geringem Aufwand. Erste Ansätze in Richtung eines Multiplex-Detektionssystems für Phycotoxine wurden von *Garthwaite et al.* [26] und *Dubois et al.* [19] vorgestellt. Bei beiden Verfahren handelt es sich um ELISA-Testsysteme, die eine parallele Detektion von ASP-, DSP-, PSP und NSP-Toxinen ermöglichen. Obwohl für jede Toxinfamilie verschiedene Extraktionsverfahren angewendet werden, wurde hier eine gemeinsame Alkoholextraktion dieser Phycotoxine eingeführt. Dabei wurde ein Nachweisvermögen (CC β) von 150 µg/kg DA, 50 µg/kg OA und 1 - 5 µg/kg STX erreicht [19]. *Campbell et al.* [194] entwickelten einen SPR-Biosensor für die parallele Detektion der ASP-, DSP- und PSP-Toxine. Dieser besteht aus 4 isolierten Kanälen, wobei in jeweils einem der Kanäle ein Hauptvertreter der einzelnen Toxinfamilien immobilisiert ist. Neben DA, OA und STX ist auch STX-Analogon (NEO) immobilisiert, um hydroxylierte und nicht-hydroxylierte STX-Analoga gleichermaßen detektieren zu können. Für die Kalibrierung bzw. Regeneration können die Kanäle unabhängig voneinander aber dennoch gleichzeitig angesteuert werden, was die Analysenzeit verglichen mit normalen SPR-Sensoren erheblich verkürzt. Bei einer einheitlich vorgegebenen Probenvorbereitung für Phycotoxine in Muschelfleisch wäre auch die Vereinigung der Kanäle für eine Probenanalyse möglich.

Innerhalb von 8 min können dabei Konzentrationen von 1,0 µg/L für DA, 1,7 µg/L OA und 1,0 µg/L Saxitoxin (zeitlich) parallel gemessen werden.

Fazit

Antikörper-basierte Testmethoden sind nicht in der Lage zwischen toxisch aktiven und inaktiven Phycotoxinen zu unterscheiden. Je nach Spezifität und Selektivität der eingesetzten Antikörper wird eine Abschätzung des vorkommenden Toxingehaltes strukturell ähnlicher Phycotoxine in einer Probe wiedergegeben. Besonders bei den PSP-Toxinen, die große Unterschiede in ihrer Toxizität aufweisen, kann die vorhandene Kreuzreaktivität problematisch sein. Im Vergleich zu den anderen beschriebenen Methoden, liegen jedoch die großen Vorteile der immunologischen Methoden darin, dass ein schnelles und sensitives Screening möglich ist. Zudem ist die Möglichkeit für Hochdurchsatz- sowie Vor-Ort-Analysen gegeben. Durch Multiplexanalysen können Resultate mit geringerem Zeitaufwand parallel für mehrere Phycotoxine erreicht und Kosten bezüglich Reagenzien und Personal gespart werden.

Angesichts der EU-Grenzwerte von 160 µg/kg für ASP-Toxine, 20 mg/kg für DSP-Toxine und 800 µg/kg für PSP-Toxine werden mit allen beschriebenen Methoden ausreichend niedrige Nachweisgrenzen erreicht. Jedoch sind für eine Identifizierung sowie Quantifizierung der verschiedenen Analoga einer Toxinfamilie die physikalisch-chemischen Verfahren unerlässlich.

2.3.4.3 Mikroarray-Technologie

Ein Untersuchungssystem, das eine Parallelisierung von Einzelnachweisen erlaubt, ist die Mikroarray-Technologie. Eine wesentliche Voraussetzung für eine parallele Detektion verschiedener Analyte ist die Immobilisierung der Fängermoleküle auf einem Träger. Die Immobilisierung der Fängermoleküle beruht dabei auf physikalischen oder chemischen Effekten. Unter einer physikalischen Immobilisierung versteht man die Adsorption oder die Einbettung der biologischen Komponenten in Gele. Hingegen werden bei einer chemischen Immobilisierung die Fängermoleküle über reaktive funktionelle Gruppen kovalent an die Trägeroberfläche gebunden. Zudem kann die kovalente Bindung durch spezielle Kupplungsreagenzien oder das Einfügen von Linkern erreicht werden. Bei der Mikroarray-Technologie wird die Multiplexfähigkeit durch eine räumlich getrennte Anordnung von Fängermolekülen erreicht, wobei diese in Form von Spots in der Größe von einigen µm in einer hochgeordneten Weise von Reihen und Spalten aufgebracht werden. Die Fängermoleküle werden dabei durch Kontaktdruckverfahren oder kontaktlos z.B. mittels

piezoelektrischer oder thermischer Tintenstrahldrucker auf der Trägeroberfläche aufgebracht [195]. Als Trägeroberfläche kommen Materialien wie Glas, Edelmetalle, Metalloxide oder Kunststoff zum Einsatz [196, 197]. Die Vielfalt der Fänger-moleküle, die für eine Immobilisierung möglich sind, ist groß. So können beispielsweise Antikörper, Aptamere, DNA und RNA als Fänger-moleküle dienen. Aber auch Antigene wie kleine Moleküle (Haptene), Bakterien und Viren können eingesetzt werden. Während eines Assays werden die Ziel-moleküle über spezifische Affinitätsbindung von den Fänger-molekülen gebunden. Das Auslesen der Bindungsereignisse erfolgt über Fluoreszenz-, Chemilumineszenz-, elektrochemische oder markierungsfreie Messung [151]. Abbildung 2.18 zeigt das Funktionsprinzip der Mikroarray-Technologie.

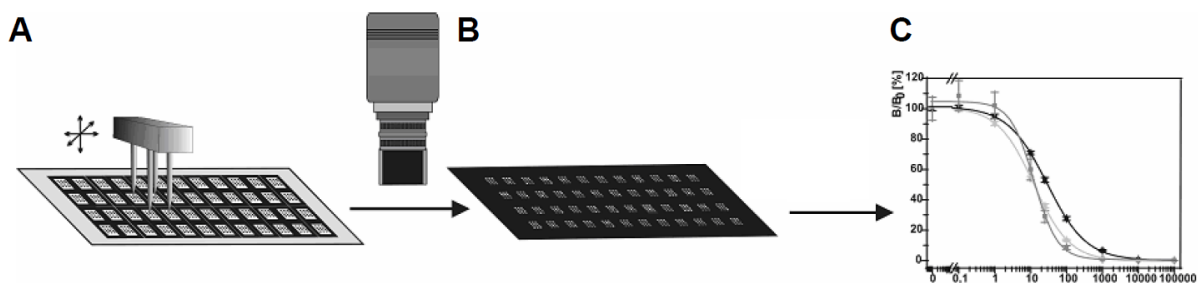


Abbildung 2.18: Funktionsprinzip der Mikroarray-Technologie: (A) Mikroarray-Produktion, (B) Detektion und (C) quantitative Analyse [198].

Durch die genau definierte Stelle der aufgetragenen Fänger-moleküle kann jedem Spot der entsprechende Analyt zugeordnet werden. Dadurch wird eine parallele Identifizierung und Quantifizierung vieler Analyte möglich, was zu erheblich verkürzten Analysezeiten führt. So findet die Mikroarray-Technologie als ein schnelles Screening-Verfahren Anwendung in vielen Gebieten wie der Diagnostik, Wasser- und Umweltanalytik sowie bei Kontrollen von Lebensmitteln [198-201].

Bis jetzt sind in der Literatur noch keine Mikroarray-Detektionssysteme im Bereich der Analytik von Phycotoxinen beschrieben. An unserem Institut wurde ein Durchfluss-Chemilumineszenz-Mikroarray-Auslesesystem (MCR3, Munich Chip Reader) für die Multiplex-Analyse verschiedener Analyte entwickelt. Das Konzept der schnellen, sensitiven und parallelen Detektion und Quantifizierung von Proben mit dem MCR3 wurde bereits mit 13 Antibiotika in Milch [202] und 4 Antibiotika in Honig [203] gezeigt. Die Übertragung dieser Anwendung auf die parallele Detektion der Phycotoxine DA, OA und STX wird in dieser Arbeit (siehe Kapitel 3.1) beschrieben.

2.3.5 Validierung analytischer Methoden

Eine Validierung analytischer Methoden gemäß der EU-Verordnung [EG 2002/657], welche für ein Monitoring von Lebensmittel relevant ist, dient der Sicherstellung, dass die entsprechenden Anforderungen für den speziell beabsichtigten Verwendungszweck erfüllt sind. Durch Laboruntersuchungen müssen validierte Messmethoden den Nachweis erbringen, dass diese unter den festgelegten Bedingungen zu zuverlässigen Ergebnissen führen und den vorgegebenen Leistungsmerkmalen wie Spezifität, Genauigkeit, Richtigkeit, Präzision, Wiederholpräzision, Reproduzierbarkeit, Wiederfindung, Nachweisvermögen oder Robustheit entsprechen. Je nach verwendeter Analysenmethode müssen verschiedene Leistungsmerkmale erfüllt sein (siehe Tabelle 2.8). Man unterscheidet dabei zwischen qualitativen und quantitativen Methoden, die wiederum in Screening- und Bestätigungsmethoden unterteilt werden. Screeningmethoden dienen dazu, aus einer Vielzahl von Proben einen Stoff oder eine Klasse von Stoffen in einer bestimmten Konzentration nachzuweisen. Positive Ergebnisse müssen jedoch zusätzlich mittels einer Bestätigungsmethode verifiziert werden.

Tabelle 2.8: Unterteilung von Analysenmethoden anhand ihrer Leistungsmerkmale, wobei S für Screeningmethoden und C für Bestätigungsmethoden steht.

		Nachweisvermögen $CC\beta$	Entscheidungsgrenze $CC\alpha$	Richtigkeit/Wiederfindung	Präzision	Selektivität/Spezifität	Anwendbarkeit/Robustheit/Stabilität
Qualitative Methode	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Quantitative Methode	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

Die Entscheidungsgrenze $CC\alpha$ ist definiert als ein Grenzwert, bei bzw. über dem, der Gehalt einer Probe als positiv angesehen wird. Eine Möglichkeit $CC\alpha$ zu bestimmen, erfolgt durch die Analyse von mindestens 20 Blankproben pro Matrix, wobei das Dreifache des Signal-Rausch-Verhältnisses als Entscheidungsgrenze bezeichnet wird. Das Nachweisvermögen $CC\beta$ hingegen bezeichnet die niedrigste Konzentration eines Stoffes, welche mit einer bestimmten Methode in einer Probe nachweisbar ist. Wie für $CC\alpha$ werden auch für die Bestimmung von $CC\beta$ 20 Blankproben pro Matrix verwendet, die jedoch zuvor mit dem Analyten in der Konzentration der Entscheidungsgrenze versetzt wurden. Das Nachweisvermögen setzt sich

zusammen aus dem Wert der Entscheidungsgrenze und dem 1,64fachen der bestimmten Standardabweichung. Unter dem Begriff Präzision versteht man die Übereinstimmung zwischen unabhängigen Ergebnissen, die unter festgesetzten Bedingungen erhalten werden. Die Präzision wird dabei durch die Streuung bzw. Standardabweichung von Messwerten angegeben. Im Vergleich dazu bezieht sich die Richtigkeit auf systematische Fehler und kann nur im Vergleich zu Referenzwerten berechnet werden. Eine analytische Methode ist spezifisch, wenn eine Komponente bzw. selektiv, wenn mehrere verschiedene Komponenten aus einer Probe störungsfrei nachgewiesen werden. Die Robustheit bezeichnet die Anfälligkeit einer analytischen Methode und setzt voraus, dass der Einfluss von unterschiedlichen Versuchsbedingungen wie Temperatur, pH-Werte oder Zusammensetzung der Probe, die eine Änderung des Analyseergebnisses hervorrufen, bekannt sind [204, 205].

2.4 Analytik von hochmolekularen Proteotoxinen

Im Gegensatz zu den Phycotoxinen stehen bei den hochmolekularen Proteotoxinen die immunologischen Testmethoden im Vordergrund [146]. Jedoch gibt es einige Ansätze diese Proteine mit physikalisch-chemischen Verfahren zu detektieren, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

2.4.1 Analytische Methoden

Für die Bestimmung von Rizin mittels physikalisch-chemischen Verfahren ist zunächst eine Anreicherung über Immunoaffinität mit anschließendem tryptischen Verdau erforderlich. Die dadurch erhaltenen Rizin-Fragmente können über Flüssigchromatographie gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) [206] oder MALDI-TOF [207] detektiert werden. In Puffer, klinischen Proben wie Speichel und Blut und Lebensmitteln wie Milch und Apfelsaft kann Rizin in einer Konzentration von 0,5 – 5 pmol nachgewiesen werden. In diesem Konzentrationsbereich ist auch eine gleichzeitige Quantifizierung von SEB möglich [207]. Eine direkte Bestimmung von SEB mit einer Nachweisgrenze von 10 µg/L [208] aus Milch, Orangen- und Apfelsaft und von 200 µg/L [209] in Wasser gelang mittels Flüssigchromatographie gekoppelter ESI-Massenspektrometrie (LC-ESI/MS). Bei den physikalisch-chemischen Verfahren handelt es sich um sehr aufwendige und nicht automatisierte Methoden mit einer Dauer von mehreren Stunden (siehe Kapitel 2.3.2).

2.4.2 Immunologische Verfahren

Im Vergleich zu den Phycotoxinen besitzen die hochmolekularen Proteotoxine Rizin und SEB mehrere Epitope, die für eine Immunisierung und Gewinnung von Antikörpern geeignet sind. Die Quantifizierung dieser Biotoxine basiert auf einem heterogenen Sandwich-Immunoassay, welcher Antigene mit mindestens zwei Epitopen erfordert. Das Prinzip eines Sandwich-Immunoassays ist schematisch in Abbildung 2.19 dargestellt.

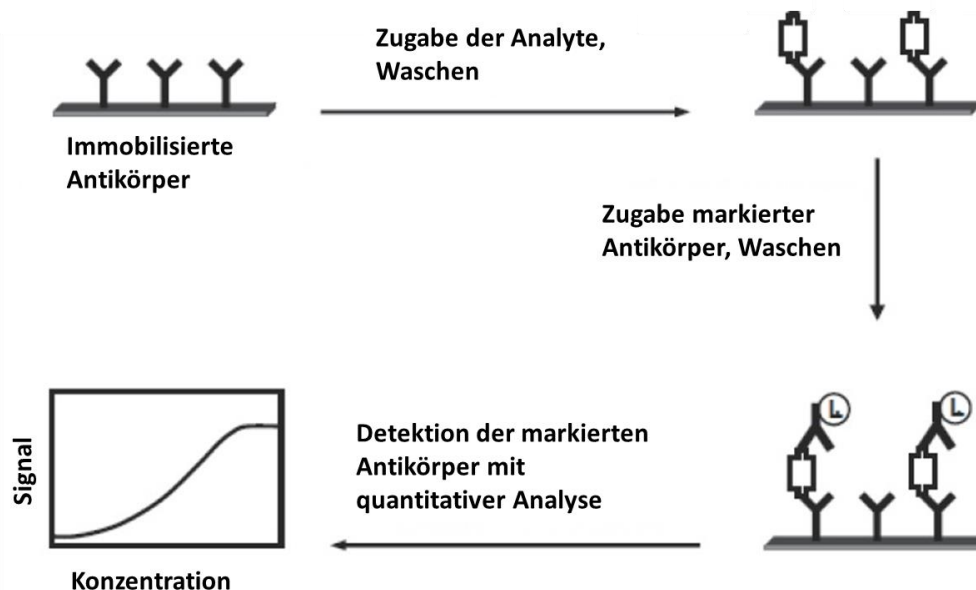


Abbildung 2.19: Sandwich-Immunoassay [150].

Hierfür werden spezifische Fänger-Antikörper auf einer Festphase immobilisiert, die vorhandene Analyte binden. Zwischen dem Zugeben der Substanzen erfolgen Waschschrte, um gebundene von nicht gebundenen Molekülen zu trennen. Mit Hilfe eines weiteren antigenspezifischen Detektionsantikörpers wird ein „Sandwich“ aus den beiden Antikörpern und dem Analyten gebildet. Der Detektionsantikörper dient dabei als Messgröße der Bindungsereignisse. Dieser kann entweder direkt markiert sein oder über einen weiteren markierten Sekundärantikörper detektiert werden. Der markierte Sekundärantikörper ist gegen eine bestimmte Tierart gerichtet und bindet bei einer parallelen Analyse unterschiedlicher Analyte alle aus diesem Tier stammenden Antikörper. Die Möglichkeiten zur Markierung der Antikörper bzw. zur Detektion der Bindungsereignisse wurden bereits im Kapitel 2.3.4 beschrieben.

Beim Sandwich-Immunoassay ergibt sich ein direkter Zusammenhang zwischen Analytkonzentration und Signalintensität. Im Vergleich zu den Analytmolekülen liegen die Antikörper beim Sandwich-Immunoassay im Überschuss vor, was zu hohen

Empfindlichkeiten führt. Ein weiterer Vorteil liegt in der hohen Selektivität, die durch die Erkennung zweier Bindungsstellen erreicht wird [152].

2.4.2.1 Einzelnachweisverfahren

Einen Überblick über die existierenden Methoden zur Detektion von Rizin und SEB geben *McGrath et al.* [210], *Ler et al.* [211], *Gooding* [212], *Musshoff et al.* [73] und *Pauly et al.* [95]. Die Nachweisgrenzen für Rizin liegen dabei in einem Bereich von 0,1 – 100 µg/L und für SEB bei 0,01 – 20 µg/L. Da mit den Multiplex-Detektionssystemen (siehe Tabelle 2.9) vergleichbare Sensitivitäten wie mit den Einzelnachweisverfahren erreicht werden, wird nicht detailliert auf die Einzelnachweisverfahren eingegangen. Zu erwähnen ist jedoch, dass die niedrigsten Nachweisgrenzen bei der Detektion von Rizin von *Lubelli et al.* [213] und *Guo et al.* [214] publiziert wurden. Die Gruppe von Lubelli kombinierte immunologische Assays mit einer exponentiellen Amplifizierung der Signale mittels PCR. Dabei wurde eine Nachweisgrenze von 10 pg/L in Puffer und Serum erreicht. Der große Nachteil dieser Methode liegt in der langen Assay-Dauer von 9 – 11 Stunden. Auch die Methode von Guo weist eine lange Assay-Dauer von ca. 14 Stunden auf. Mit ihren eigens produzierten Antikörpern erhielt die Gruppe eine Nachweisgrenze von 0,03 µg/L in einem Sandwich-Immunoassay in Mikrotiterplatten.

Für SEB wurde die niedrigste Nachweisgrenze von *Haes et al.* [215] beschrieben. Die Gruppe wies SEB in einer Konzentration von 25 pg/L in einem kompetitiven Immunoassay mit Fluoreszenzdetektion in 50 min nach. Die geringe Nachweisgrenze wird durch eine Probenanreicherung aufgrund unterschiedlicher elektrischer Feldstärken und chromatographischer Immunoaffinität begründet. Nachteil dieser Methode ist jedoch die falsch-positive Detektion von BSA.

2.4.2.2 Multiplexnachweisverfahren

Die Anforderungen, welche gemäß *Gooding* [212] an Detektionssysteme gestellt werden, sind eine simultane Analyse mehrerer Analyte in möglichst kurzer Zeit mit vergleichbaren Sensitivitäten wie die Einzelnachweisverfahren. Ein hoher Grad an Automatisierung, geringer Verbrauch von Reagenzien, hoher Probendurchsatz, Transportfähigkeit und Robustheit gegenüber komplexen Matrices sind weitere Anforderungen. Im Folgenden werden verschiedene Multiplex-Detektionssysteme vorgestellt, die die genannten Aspekte unterschiedlich gut erfüllen.

Für die parallele Detektion hochmolekularer Biotoxine wurden Sandwich-Immunoassays im Mikrotiterplatten-Format entwickelt. Eine Möglichkeit für die Auslesung der Signale stellen *quantum dots* dar, welche an Detektionsantikörper gebunden wurden und eine Partikelgrößenabhängige Fluoreszenz-Emission zeigten. Unter Verwendung einer Anregungswellenlänge werden die verschieden großen Partikel gleichzeitig zur Emission bei mehreren Wellenlängen angeregt. Anhand der Emissionswellenlänge kann die Bindung der verschiedenen Analyte unterschieden werden und so eine Multiplex-Analyse erfolgen. Neben zwei weiteren Toxinen konnten Nachweisgrenzen von 30 µg/L für Rizin und 3 µg/L für SEB in Puffer nach 3 – 4 Stunden erreicht werden [216]. Bei einer ähnlichen Assay-Dauer wurden niedrigere Nachweisgrenzen von 0,1 µg/L für Rizin und 0,01 µg/L für SEB in Puffer [217] über fluoreszierende Avidin-gekoppelte Nanopartikel erreicht, welche über Biotin an die Detektionsantikörper binden. Auch konnte die Anwendung in Matrix mit Nachweisgrenzen von 1 µg/L für Rizin und 0,1 µg/L für SEB gezeigt werden [217].

Ein weiteres stationäres System zur Toxin-Detektion ist das ArrayTube™ System, bei dem ein Antikörper-Mikroarray im Boden eines Standard-Reaktionsgefäßes integriert ist. Das Testprinzip beruht ebenfalls auf einem heterogenen Sandwich-Immunoassay und wird durch Präzipitation der zugebenen Komponenten erreicht. Die Detektion erfolgt kolorimetrisch, wobei die Signale durch den Einsatz von SA-PolyHRP amplifiziert werden. Dieses System wurde für den simultanen Nachweis von 14 verschiedenen bioterroristisch relevanten Agenzien getestet und führt zu Nachweisgrenzen von 1 µg/L für Rizin und 0,2 µg/L für SEB [218]. Im Vergleich zum Sandwich-ELISA im Mikrotiterplatten-Format wird mit dem ArrayTube™ System ein Ergebnis mit ausreichender Sensitivität in kürzerer Zeit (60 min) erzielt.

Ein weiteres Multiplex-Detektions-Verfahren stellt die Luminex® xMAP™-Technologie [219] dar. Diese Technologie kombiniert die Durchflusszytometrie mit einem Suspension-Partikelarray. Für die Detektion der Analyte werden mikroskopisch kleine Polystyrol-Partikel (Beads) benötigt, die in einem genauen Verhältnis mit roten und infraroten Fluoreszenz-Farbstoffen kodiert sind. Dadurch ergeben sich 100 spektral unterscheidbare Beads. In einem Assay dienen die Beads als Festphase für die Immobilisierung spezifischer Fänger-Antikörper gegen hochmolekulare Proteotoxine. Über einen weiteren Biotin-markierten Antikörper werden die gebundenen Antigene markiert. Der spezifische Nachweis der Bindungsereignisse erfolgt über ein Konjugat (Streptavidin gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin) in einem Durchflusszytometer. Die Beads und deren gebundene Zielmoleküle werden dabei durch Laser klassifiziert und anhand der Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes quantifiziert.

Mit dieser Technologie konnten neben Abrin und Botulinum Toxin Nachweisgrenzen von 10 – 100 µg/L für Rizin und 3 – 30 µg/L für SEB in PBS-Puffer, Säuglingsnahrung, Schokoladenmilch und Gemüsesaft [220] erreicht werden. In Milchpulverproben lag die Nachweisgrenze bei 5,4 µg/L für Rizin und 0,1 µg/L für SEB [221]. Die xMAPTM-Technologie wurde von *Pauly et al.* [95] weiterentwickelt, indem die Gruppe Beads mit magnetischen Eigenschaften benutzte. Die magnetische Komponente ermöglicht eine einfache Entfernung aus komplexen Matrices mit gleichzeitiger Anreicherung der Beads. Durch die immunomagnetische Anreicherung liegen die Nachweisgrenzen in Puffer und Matrix im Bereich von 0,002 – 0,004 µg/L für Rizin und 0,0003 – 0,003 µg/L für SEB. Trotz der erreichten hohen Sensitivität wirkt sich die lange Assay-Dauer von 3,5 Stunden inklusive dem zeitintensiven Filtrationsschritt von 1 – 2 h nachteilig für dieses Verfahren als schnelle Nachweis-Methode aus.

Neben den zeit- bzw. laborintensiven Methoden wurden schnelle, portable und automatisierte Detektionssysteme wie der BDG (*Bidiffractive grating*) Biosensor [222], der Faser-Optik-basierte Biosensor RAPTOR [223] und der QTL Biosensor 2200R [212] für die parallele Detektion von hochmolekularen Biotoxinen entwickelt. Beim BDG Biosensor sind die Fänger-Antikörper auf einem Doppelgitter immobilisiert. Der Nachweis der Toxine und Bakterien erfolgt innerhalb von 15 min über Gold-gekoppelte Antikörper anhand ihrer Lichtbeugung. Mit diesem Biosensor erhält man Nachweisgrenzen von 5 µg/L für Rizin und 1 µg/L für SEB in Puffer. Der Nachweis der Biotoxine mit dem RAPTOR-System basiert auf Antikörper-beschichteten Lichtwellenleitern und Fluoreszenz-gekoppelten Detektionsantikörpern. Innerhalb von 3 – 10 min werden Rizin mit einer Nachweisgrenze von 50 µg/L und SEB mit 10 µg/L neben Bakterien bestimmt. Der QTL Biosensor 2200R weist vorhandene Biotoxine in 10 min durch Fluoreszenzemission nach. Dafür wurden die Antikörper auf magnetischen Beads aufgebracht, die mit einem fluoreszierenden Polymer beschichtet sind. Die Bindung der Antigene verhindert die Bindung des Quenchers und Fluoreszenz ist messbar. Nachteilig wirkt sich bei diesen System aus, dass die parallele Detektion lediglich auf vier Toxine beschränkt ist. Die Sensitivitäten liegen mit Nachweisgrenzen im unteren bis mittleren µg/L-Bereich, was im Hinblick auf die Vorteile dieser Systeme wie Portabilität und kurze Assay-Zeiten von einigen Minuten (3 – 15 min) ausreichend ist.

Ein weiteres schnelles, transportfähiges und automatisiertes System ist der NRL Array Biosensor [224, 225] mit dem ein paralleler Nachweis von 9 Analyten in 15 min möglich ist. Das Testprinzip beruht auf einem Antikörper-Mikroarray, wobei die Fänger-Antikörper auf

einer Glasoberfläche immobilisiert sind. Die Detektion der gebundenen Toxine erfolgt über Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper, die durch einen Laser angeregt werden. Neben diversen Toxinen, Viren und Bakterien werden Nachweisgrenzen von 8 µg/L für Rizin in Puffer und 0,1 – 0,5 µg/L für SEB in Puffer und Matrix erreicht [226]. Weitere ähnliche Antikörper-Mikroarray-Systeme wurden entwickelt, bei welchen die Fänger-Antikörper auf Avidin-beschichteten Glasoberflächen [227], polymerbeschichteten Trägern [228] oder in Gelmatrix [229] fixiert sind. Der Nachweis der Biotoxine erfolgt dabei über Fluoreszenz-markierte Antikörper mit Nachweisgrenzen im Bereich von 0,1 – 10 µg/L für Rizin und 1 – 4 µg/L für SEB.

Die beschriebenen Multiplex-Detektions-Methoden für die hochmolekularen Proteotoxine Rizin und SEB sind in der Tabelle 2.9 vergleichend gegenübergestellt.

Tabelle 2.9: Zusammenfassung der Multiplex-Detektions-Methoden.

Methoden	x	Antigen	LOD [µg/L]	Matrix	Assay-Dauer [min]	Literatur
Antikörper-Mikroarray	3	Rizin SEB (Cholera Toxin)	0,1 – 1 0,01 – 0,1	Puffer Milch, Apfelsaft, Blut	210 – 240	[217]
Antikörper-Mikroarray	3	Rizin SEB (Botulinum Toxin)	1 – 5 1 – 50	Puffer Milch	90	[228]
Antikörper-Mikroarray	4	Rizin SEB (Cholera Toxin, <i>Bacillus globigii</i>)	10 4	Puffer	15	[227]
Antikörper-Mikroarray (Hydrogel-basiert)	6	Rizin SEB (Diphtherie Toxin, Tetanus Toxin, Antrax Toxin, Viscumin)	0,1 1	Puffer	~1000	[229]
ArrayTube™	14	Rizin SEB (Viren,	1 0,2	Puffer	60	[218]

		Bakterien)				
BDG Biosensor	4	Rizin, SEB (Botulinum Toxin, <i>Francisella tularensis</i>)	5 1	Puffer	15	[222]
NRL Biosensor	12	Rizin SEB (Toxine, Viren, Bakterien)	8 0,1 – 0,5	Puffer Nur für SEB: Klinische Proben (Blut, Speichel), Umwelt- (Pollen, Sand) und Lebensmittelproben (Milch, Melonen, Apfelsaft)	30 – 45	[224, 225]
RAPTOR	4	Rizin SEB (Botulinum Toxin, <i>Bacillus subtilis</i>)	50 10	Puffer	3 – 10	[223]
QTL Biosensor 2200R	4	Rizin SEB (Botulinum Toxin, Anthrax Sporen)	1 1		10	[212]
<i>Quantum dots</i> basierter Immunoassay	4	Rizin SEB (Cholera Toxin, Shiga-like Toxin 1)	30 3	Puffer	180 – 240	[216]
xMAP™- Technologie	6	Rizin SEB (Botulinum Toxin, Abrin, SEA, SEC)	10 – 100 3 – 30	Puffer, Schokoladenmilch, Säuglingsnahrung, Gemüsesaft		[220]
xMAP™- Technologie	5	Rizin SEB (Anthrax Sporen, <i>Yersinia pestis</i> , SARS- Coronavirus)	5,4 0,1	Milchpulverproben		[221]

xMAP™- Technologie	5	Rizin	0,002 – 0,004	Puffer, Milch, Kaffee, Karottensaft,	210 h	[95]
		SEB	0,0003 – 0,003	Säuglingsnahrung, Joghurt		
		(Botulinum Toxin, Abrin)				

x = Anzahl der parallel gemessenen Analyte

Fazit:

Im Vergleich zu Phycotoxinen sind bei den hochmolekularen Proteotoxinen schon viele Multiplex-Detektionssysteme etabliert, die ausreichend niedrige Sensitivitäten aufweisen. Stationäre Systeme wie ELISA-Testsysteme, die ArrayTube™- und xMAP™-Technologie weisen lange Assay-Zeiten mit mehr als einer Stunde auf. Eine verkürzte Assay-Dauer wie bei den Durchfluss-Antikörper-Mikroarrays, führt jedoch zur Erhöhung der Nachweisgrenzen in den unteren µg/L-Bereich.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Phycotoxine

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Optimierung eines Mikroarray-basierten Nachweises zur ständigen Überwachung der Grenzwerte für Phycotoxine in lebenden Speisemuscheln. Für den simultanen Nachweis der Muscheltoxine Domoinsäure (DA), Okadasäure (OA) und Saxitoxin (STX) wurden Durchfluss-Chemilumineszenz-Mikroarrays entwickelt. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte zur Entwicklung und Optimierung des Phycotoxin-Mikroarrays beschrieben.

3.1.1 Assay-Prinzip

Die Detektion der Phycotoxine Domoinsäure, Okadasäure und Saxitoxin basiert auf einem indirekt kompetitiven Immunoassay (Abbildung 3.1), da es sich bei den Phycotoxinen um kleine Analyte (< 1 kDa) handelt.

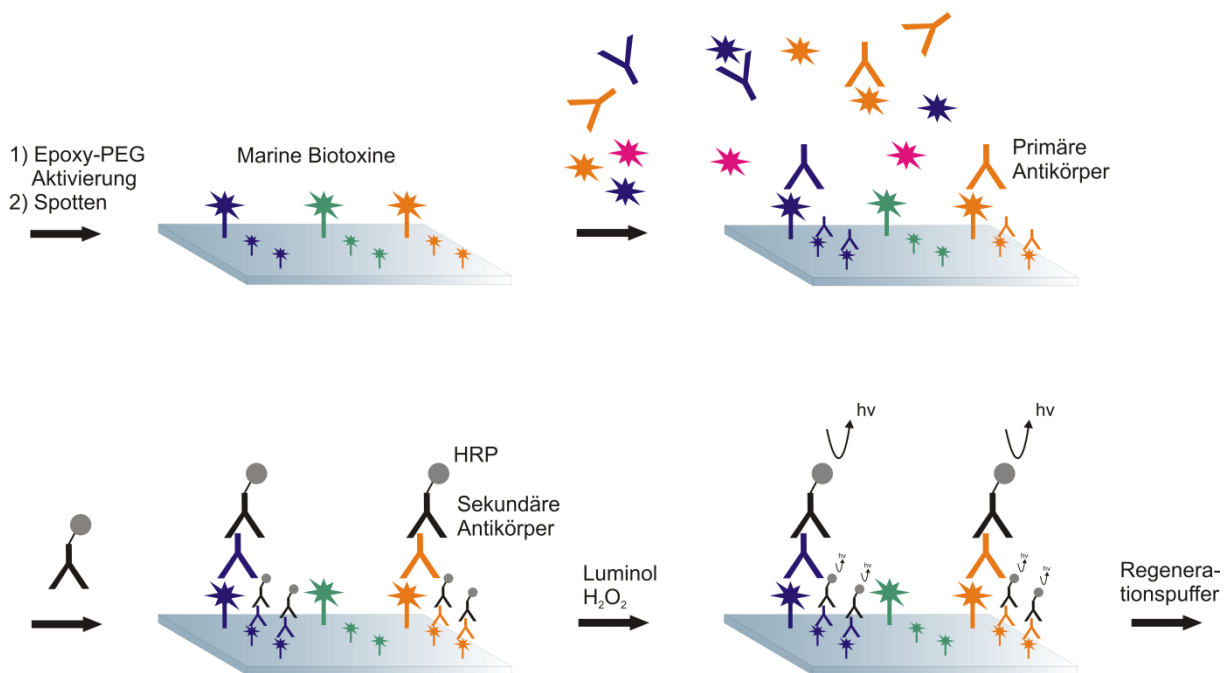


Abbildung 3.1: Indirekt kompetitiver Immunoassay für Phycotoxine.

Für die Analyse mittels indirekt kompetitiven Immunoassay wurden die Phycotoxine auf einer EpoxyPEG-modifizierten Glasoberfläche immobilisiert. Der parallele Nachweis von DA, OA und STX erfolgte durch simultane Zugabe aller Analyte und der entsprechenden Antikörper. Hierzu wurden die Kalibrierstandards bzw. die zu analysierenden Proben zunächst mit einer definierten Menge an Antigen-spezifischen Primärantikörpern vermischt, für 1 min in der

Inkubationsschleife des Mikroarray-Auslese-Systems (MCR3) inkubiert und anschließend über den Mikroarray-Chip geleitet. Dies führte zu einer Konkurrenzreaktion zwischen den auf der modifizierten Glasoberfläche immobilisierten Phycotoxinen und den freien Phycotoxinen um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindestellen. Dabei gilt, je höher die Toxinkonzentration in der Probe ist, desto weniger Primärantikörper binden an die Phycotoxine auf der Festphase. Die gebundenen Primärantikörper wurden mithilfe von Sekundärantikörpern detektiert, die mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, *Horseradish peroxidase*) markiert sind. Dieses Enzym katalysiert die Chemilumineszenz-(CL)-Reaktion mit den Substraten Wasserstoffperoxid und Luminol, wobei die resultierenden CL-Signale von einer CCD-Kamera aufgenommen wurden.

Als letzter Assay-Schritt wurde Regenerationspuffer über den Mikroarray gepumpt, um die Bindung zwischen Analyten und Primärantikörpern zu trennen und so denselben Mikroarray-Chip für eine erneute Messung eines Standards bzw. einer Probe einsetzen zu können. Alle aufeinanderfolgenden Schritte des Assays wurden mithilfe des MCR3 durchgeführt.

3.1.2 Optimierung der Immobilisierungs-Bedingungen für Phycotoxine

Für die Anwendung neuer Applikationen auf der Durchfluss-Mikroarray-Plattform MCR3 wurde zunächst eine Immobilisierungsstrategie für Phycotoxine entwickelt. Die Muscheltoxine können nur dann in einer Multiplex-Messung nachgewiesen werden, wenn diese auf derselben chemisch modifizierten Oberfläche eines Mikroarrays immobilisiert sind. Um eine erfolgreiche Immobilisierung zu gewährleisten, wurden Parameter wie Oberflächenaktivierung, Spottingpuffer und Inkubationsbedingungen nacheinander optimiert. Für die Oberflächenaktivierung haben sich die Aktivierungsmethoden NHS- [230] und EpoxyPEG-Aktivierung [202] etabliert. Eine weitere Möglichkeit bestand darin, die Phycotoxine direkt auf die DAPEG-Oberfläche aufzutragen [231]. Bei allen drei Modifikationen der Glasoberflächen der Mikroarrays wurden nach einer direkten Auftragung der Phycotoxine CL-Signale verzeichnet. Mit einem Signal-Rausch-Verhältnis (SNR, *signal-to-noise ratio*) von 29 für DA zeigte die EpoxyPEG-aktivierte Oberfläche die höchsten relativen Signalintensitäten (Abbildung 3.2) verglichen mit den anderen modifizierten Glasoberflächen. Im Folgenden wurden somit alle Phycotoxine direkt auf EpoxyPEG-aktivierte Chipoberflächen aufgetragen.

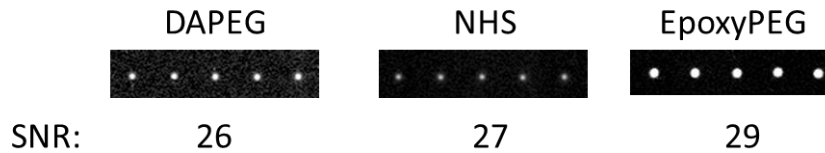


Abbildung 3.2: Vergleich der Aktivierungsmethoden von Glasoberflächen anhand von DA.

Weiterhin wurden die Spottingpuffer im Hinblick auf homogene, runde und scharf abgegrenzte Spots optimiert. PBS- und Carbonat-Puffer zeigten keinen Einfluss auf die Form der Spots bzw. CL-Signalstärke. Additive wie Pluronic F127 im Spottingpuffer führten zu leicht verschwommenen Spots (Abbildung 3.3).

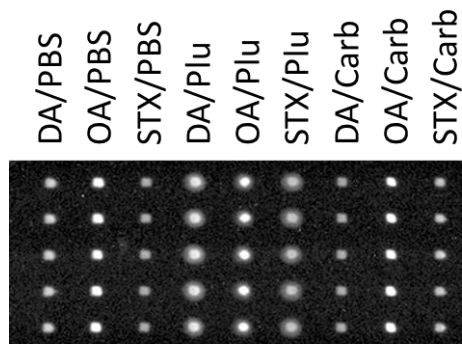


Abbildung 3.3: CCD-Aufnahme der Phycotoxine in verschiedenen Spottingpuffern auf der EpoxyPEG-Oberfläche.

Um hohe Signalintensitäten zu erhalten, wurden die Phycotoxine direkt in höchst möglicher Konzentration ohne weitere Zusätze auf die EpoxyPEG-aktivierte Chipoberfläche aufgetragen. Bei den verfügbaren Lösungen handelte es sich um 1 g/L DA in Wasser, 1 g/L OA in DMSO und 0,1 g/L in Ethanol-Wasser bei pH 3.

Auch der Einfluss der Temperatur wurde auf die Größe, Form und Homogenität der Spots untersucht. Die Mikroarrays mit den aufgetragenen Muscheltoxinen wurden nach dem Spotten über Nacht bei 4°C sowie bei 25°C und 50°C bei jeweils einer Luftfeuchtigkeit von 55% inkubiert. Niedrige Temperaturen (4°C) führten zu verschmierten Spots. Hingegen wurden mit erhöhten Temperaturen (50°C) inhomogene Spots erhalten. Die besten Bedingungen für die Immobilisierung der Muscheltoxine auf der modifizierten Glasoberfläche wurden bei 25°C und 55% Luftfeuchte erreicht. In Abbildung 3.4 sind die CCD-Aufnahmen repräsentativ für OA gezeigt.



Abbildung 3.4: CCD-Aufnahmen von OA bei verschiedenen Inkubationstemperaturen nach dem Spotten.

Mit den optimierten Bedingungen wurden die Muscheltoxine in der Anordnung OA, DA und STX auf jedem Mikroarray-Chip aufgetragen. Die Auftragung dieser Reihenfolge wurde dreimal wiederholt, was in jeweils 3 Reihen mit 5 Replikaten pro Phycotoxin resultierte. Dadurch wurde für jedes Toxin eine Gesamtzahl von 15 Wiederholungen erreicht. Bei paralleler Zugabe aller spezifischen Antikörper gegen die drei Muscheltoxine wurde das beschriebene Spottingmuster in Abbildung 3.5 visualisiert.

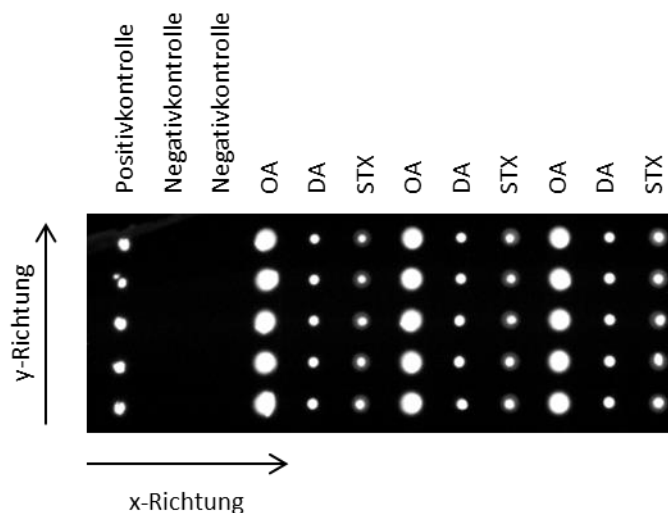


Abbildung 3.5: CCD-Aufnahme unter Einsatz der optimierten Immobilisierungs-Bedingungen.

3.1.3 Bestimmung der Varianzen eines Phycotoxin-Mikroarrays

Varianzen in den CL-Signalen können beispielsweise durch ungleichmäßige oder unreproduzierbare Absetzung der Phycotoxin-Lösungen im Spottingprozess entstehen. Zudem handelt es sich bei der Mikroarray-Auslese-Plattform MCR3 um ein Durchfluss-System, so dass die Fließrichtung der Lösungen auch einen Einfluss auf die Position der immobilisierten Muscheltoxine haben kann. Um diese Effekte auszuschließen, wurden die Varianzen der CL-Signale eines Phycotoxin-Mikroarrays (siehe Abbildung 3.5) in x- sowie in y-Richtung mittels der Testmittelpunkte (IC_{50} -Werte) der Kalibrierkurven bestimmt. Innerhalb einer Reihe (y-Richtung) wurde die Intra-Assay-Varianz zu 4,1% für DA, 10,9% für OA und 10,0% für STX unter Berücksichtigung von jeweils fünf Replikaten berechnet. Für die Bestimmung

der Intra-Assay-Varianz in x-Richtung wurden jeweils die drei Reihen jedes Muscheltoxins berücksichtigt. Die Intra-Assay-Varianz in x-Richtung resultierte in 3,0% für DA, 7,5% für OA und 10,5% für STX. Bei Vergleich der Intra-Assay-Varianzen in horizontaler und vertikaler Richtung wurden nur geringe Abweichungen festgestellt. Daraus wurde gefolgert, dass die CL-Signalintensität unabhängig von der gespotteten Position bzw. der Fließrichtung ist und die Phycotoxine auf jeder beliebigen Position auf dem Mikroarray-Chip immobilisiert werden können. Je nach Fragestellung kann das Array-Muster (Spot-, Reihen- und Spaltenanzahl) somit beliebig gewählt und erweitert werden. So kann der Phycotoxin-Mikroarray durch direkte Auftragung dieser Toxine im Spottingprozess auf weitere Phycotoxine erweitert werden.

3.1.4 Bestimmung der Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper

3.1.4.1 Bestimmung der Antikörper-Spezifität

Eine notwendige Voraussetzung, um Multiplex-Messungen durchführen zu können, ist bestehende Kreuzreaktivitäten der Detektionsantikörper zu unspezifischen Antigenen festzustellen. Die Kreuzreaktivität der drei Phycotoxine wurde bestimmt, indem drei Mikroarray-Chips mit dem Spottingmuster aus Abbildung 3.5 verwendet wurden. Pro Chip wurde jeweils ein spezifischer Detektionsantikörper in die Flusszelle geleitet. Auf jedem der drei Mikroarrays wurden nur für die gewünschten Antigen-Antikörper-Paare CL-Signale erhalten (Abbildung 3.6).

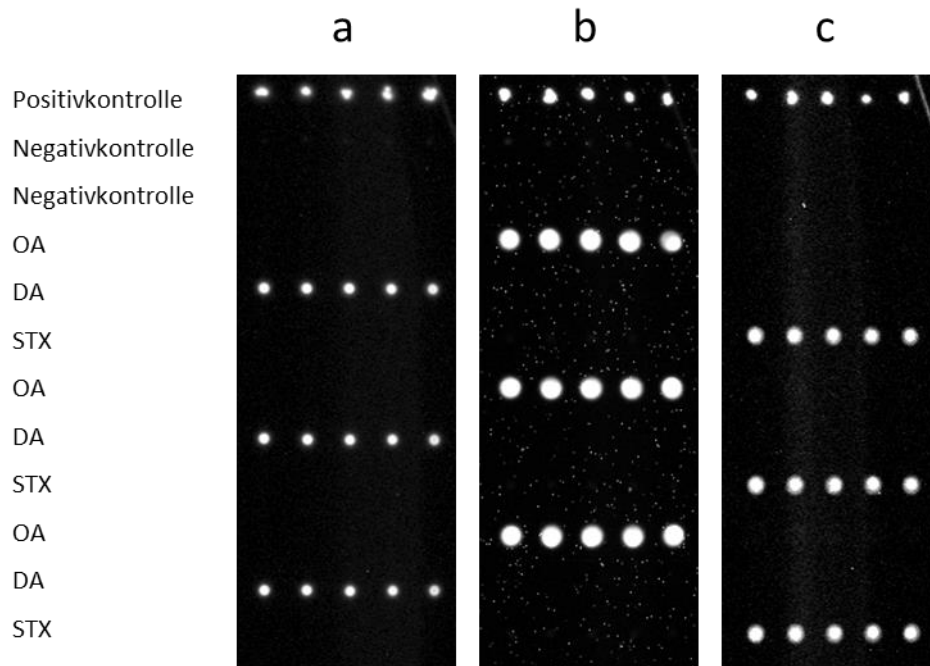


Abbildung 3.6: CCD-Aufnahme der CL-Signale mit den Antikörpern anti-DA (a), anti-OA (b) und anti-STX (c).

Es wurden keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen einem bestimmten Antikörper mit den anderen Phycotoxinen beobachtet. Ebenso wurde keine unspezifische Bindung der primären Antikörper an die Chipoberfläche festgestellt. Da während der Kalibrierung keine Inhibierung bei Verwendung eines bestimmten Antikörpers mit den anderen Phycotoxinen auftrat, war eine Berechnung der Kreuzreaktivität (KR_{TMP}) gemäß Gleichung (1) über die Testmittelpunkte (TMP) der Kalibrierkurven [232] nicht möglich.

$$KR_{TMP} [\%] = \frac{\text{Testmittelpunkt (Standard)}}{\text{Testmittelpunkt (Analyt)}} \cdot 100\% \quad (\text{Gleichung 1})$$

Somit wurden die prozentualen Kreuzreaktivitäten ($KR_{CL\text{-Signal}}$) über die CL-Signale abgeschätzt. Dazu wurde der Quotient aus den CL-Signalintensitäten der Kreuzreaktanten mit denen der Analyten gebildet (siehe Gleichung 2, [233]).

$$KR_{CL\text{-Signal}} [\%] = \frac{\text{CL-Signale (Kreuzreaktant)}}{\text{CL-Signale (Analyt)}} \cdot 100\% \quad (\text{Gleichung 2})$$

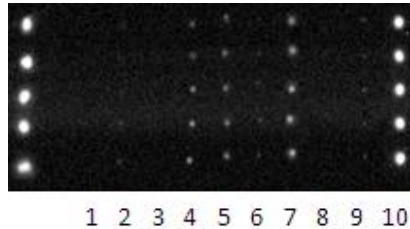
Die Kreuzreaktivität von anti-DA zu DA wurde auf 100% gesetzt, wodurch Kreuzreaktivitäten von 0,4% für OA und STX resultierten. Für den anti-OA ergaben sich

Kreuzreaktivitäten von 2,0% für DA, 100% für OA und 2,3% für STX. Die Verwendung von anti-STX führte zu 1,9% Kreuzreaktivität für DA und OA sowie 100% für STX.

3.1.4.2 Kreuzreaktivität von anti-STX zu STX-Analoga

Die PSP-Toxine besitzen eine gemeinsame Kernstruktur, variieren jedoch verglichen mit STX an vier Positionen (siehe Abbildung 2.4). Bis jetzt wurden 57 existierende Derivate gefunden. Einige dieser Derivate unter anderem NEO, GXT 1/4, GTX 2/3, GTX 5, C1/C2, dcSTX, dcNEO und dcGTX 2/3 wurden auf ihre Kreuzreaktivität bezüglich anti-STX untersucht. Eine Bestimmung der Kreuzreaktivitäten ist notwendig, um herausfinden, welche Derivate zu einer Unter- bzw. Überbestimmung führen und somit den STX-Gehalt in Muschelproben verändern können.

Hierfür wurden neben STX die genannten Derivate auf einem Mikroarray immobilisiert. Für die Erzeugung der CL-Signale wurde nur anti-STX verwendet. Eine repräsentative CCD-Aufnahme ist in Abbildung 3.7 gezeigt, wobei auf den Position (1) die Positivkontrolle, (2) die Negativkontrolle, (3) NEO, (4) GXT 1/4, (5) GTX 2/3, (6) GTX 5, (7) C1/C2, (8) dcSTX, (9) dcNEO, (10) dcGTX 2/3 und (11) STX immobilisiert sind.



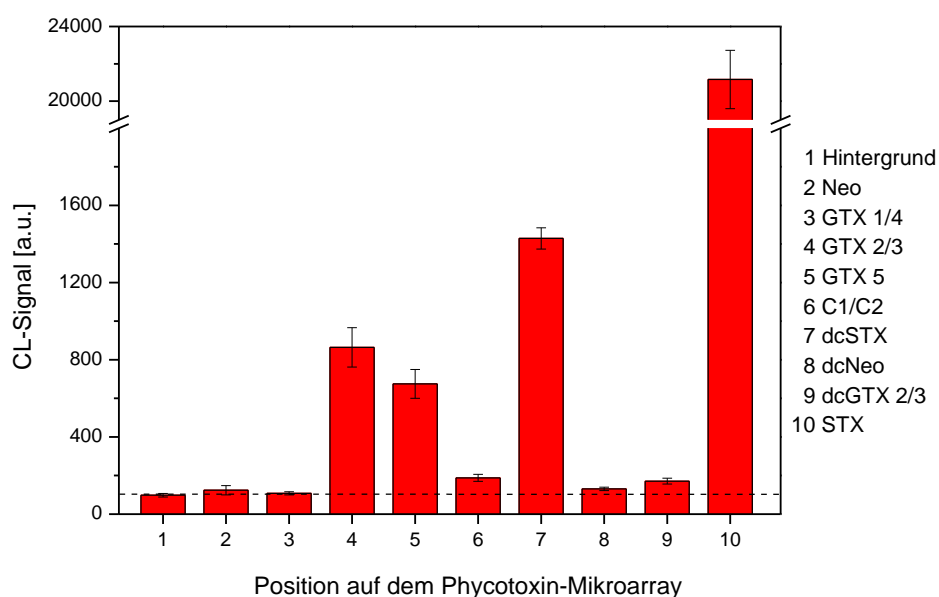


Abbildung 3.7: CCD-Aufnahme von STX sowie seinen Analoga und Darstellung ihrer CL-Signale ($m = 5$, $n = 10$).

Die CL-Signale für STX und seine Derivate sind in Abbildung 3.7 aufgetragen. Für die Berechnung der Kreuzreaktivität wurden die erhaltenen CL-Signale normiert, wobei die höchste CL-Signalintensität, die für STX erhalten wurde, auf 100% gesetzt wurde. Die berechneten Kreuzreaktivitäten gemäß Gleichung 2 über die normierten CL-Signale betragen 4,1%, 3,2% und 6,8% für die STX-Analoga GTX 2/3, GTX 5 und dcSTX. Aufgrund der erreichten CL-Signalintensitäten dieser Analoga wurde angenommen, dass Kreuzreaktivitäten zu anti-STX bestehen. Die weiteren Analoga unterschieden sich nicht merklich von dem normierten Hintergrundsignal, welches zu 0,5% Kreuzreaktivität berechnet wurde. In der Tabelle 3.1 sind die normierten Werte der CL-Signale zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Bestimmung der Kreuzreaktivität von anti-STX zu den STX-Analoga über CL-Signalintensitäten und über IC_{50} -Werte aus SPR-Messungen des Kooperationspartners.

Position auf dem Phycotoxin-Mikroarray	PSP-Toxine	Kreuzreaktivität [%] bestimmt über CL-Signalintensitäten	Kreuzreaktivität [%] bestimmt über IC_{50} -Werte mit SPR
1	Hintergrund	0,5	-
2	NEO	0,6	1,0
3	GTX 1/4	0,5	1,2
4	GTX 2/3	4,1	123,9
5	GTX 5	3,2	129,6

6	C1/C2	0,9	148,4
7	dcSTX	6,8	209,1
8	dcNEO	0,6	4,1
9	dcGTX 2/3	0,8	184,0
10	STX (100 µg/L)	100,0	100,0

Auf dem MCR3 war eine Bestimmung der Kreuzreaktivität von anti-STX zu den STX-Analoga über Kalibrierungen zum einen nicht möglich, da nicht ausreichend hohe CL-Signale für eine Kalibrierung mit den immobilisierten Analoga erreicht werden konnten. Zum anderen wirkte sich bei Kalibrierung der Analoga mit dem immobilisierten STX der Regenerationseffekt so stark aus, dass keine stabilen oberen Asymptoten verglichen mit der Kalibrierkurve von STX erhalten wurden. Für die Analoga GTX1/4, NEO und dcNEO konnte zudem keine Inhibierung des CL-Signals beobachtet werden.

Ein Vergleich mit den bestimmten Kreuzreaktivitäten über die IC_{50} -Werte aus den SPR-Messungen des Kooperationspartners Institute of Agri-Food and Land Use (IAFLU) zeigte, dass die drei Analoga GTX1/4, NEO und dcNEO auch zu vernachlässigbar geringen Kreuzreaktivitäten von 1,2%, 1,0% und 4,1% führten. Eine gute Übereinstimmung der vorhandenen Kreuzreaktivität wurde zudem bei den Analoga GTX 2/3, GTX 5 und dcSTX erhalten, wobei dcSTX mit 209,1% die höchste Kreuzreaktivität in den SPR-Messungen zeigte. Für die Analoga C1/C2 und dcGTX2/3 wurden, verglichen mit GTX1/4, NEO und dcNEO, nur gering höhere Kreuzreaktivitäten von 0,9% und 0,8% über die CL-Signalintensitäten erhalten. Im Gegensatz dazu, zeigten diese zwei Analoga hohe Kreuzreaktivitäten von 148,4% und 184,0% in den SPR-Messungen.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass durch die Immobilisierung von STX sowie aller STX-Analoga auf einem Mikroarray eine zeitsparende Alternative zur Abschätzung der Kreuzreaktivitäten nur über den Vergleich von CL-Signalintensitäten gezeigt wurde. Die Konzentrationen der STX-Analoga betragen zwischen 10 µg/L für dcNEO bis 70 µg/L für C1/C2. Für eine bessere Abschätzung der Kreuzreaktivitäten von anti-STX über die CL-Signalintensitäten mit nur einem Mikroarray-Chip, wären Konzentrationen aller STX-Analoga von mindestens 100 µg/L wünschenswert.

3.1.5 Optimierung des Messprogramms

Zur Identifizierung und Quantifizierung der Phycotoxine wurde ein Protokoll für die Messungen am MCR3 entwickelt. Basierend auf dem Messprogramm für den Nachweis von Antibiotika [202] wurden einige Parameter des Protokolls optimiert. Mögliche Ansatzpunkte zur Optimierung eines Messprotokolls basieren beispielsweise auf der Vorinkubation von Analyten und Antikörper, der Einstellung der Flussraten und der Anpassung von Antikörper-Konzentrationen. Weitere mögliche Parameter sind Temperatur, Konzentration der Chemilumineszenz-Substrate und Anzahl der Waschzyklen. Der wirksamste Einfluss zur Erhöhung der CL-Signalintensitäten zeigte sich jedoch bei der Variation der Flussraten sowie der Antikörper-Konzentration.

3.1.5.1 Flussrate der Primärantikörper

Die Zugabe der primären Antikörper wurde bei Geschwindigkeiten von 1 $\mu\text{L/s}$, 2 $\mu\text{L/s}$, 5 $\mu\text{L/s}$ und 10 $\mu\text{L/s}$ untersucht. Die Auswirkung der Flussraten auf die maximale CL-Signalintensität sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

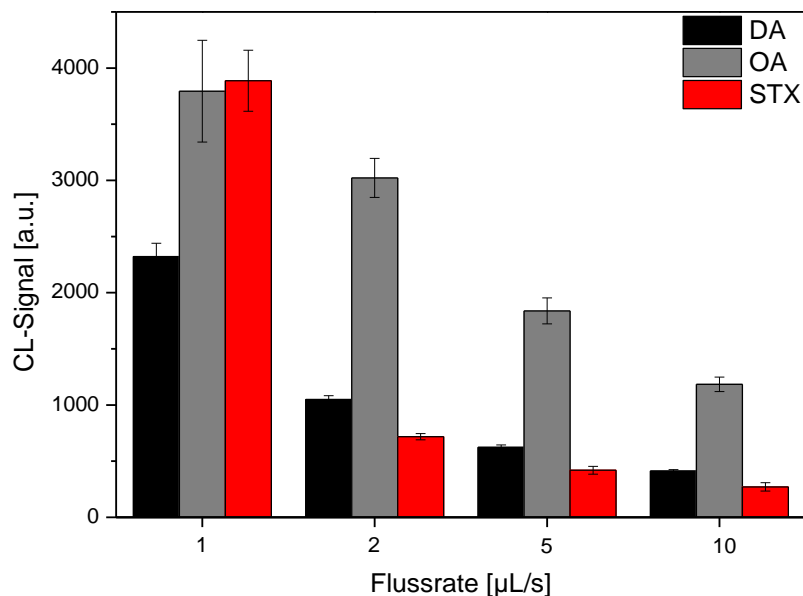


Abbildung 3.8: Signalintensität in Abhängigkeit der Flussrate der primären Antikörper ($m = 5$, $n = 4$).

Mit geringeren Flussraten wurden höhere Signalintensitäten erreicht. Bei geringeren Flussraten erhöht sich die Interaktionszeit für die Bindung der Antikörper an die immobilisierten Antigene, wodurch die höheren CL-Signale erzielt wurden. Neben der Signalintensität spielt bei der Konzeptionierung eines Assays auch die Analysendauer eine wichtige Rolle. In Tabelle 3.2 ist die Assay-Dauer in Abhängigkeit der Flussrate aufgetragen.

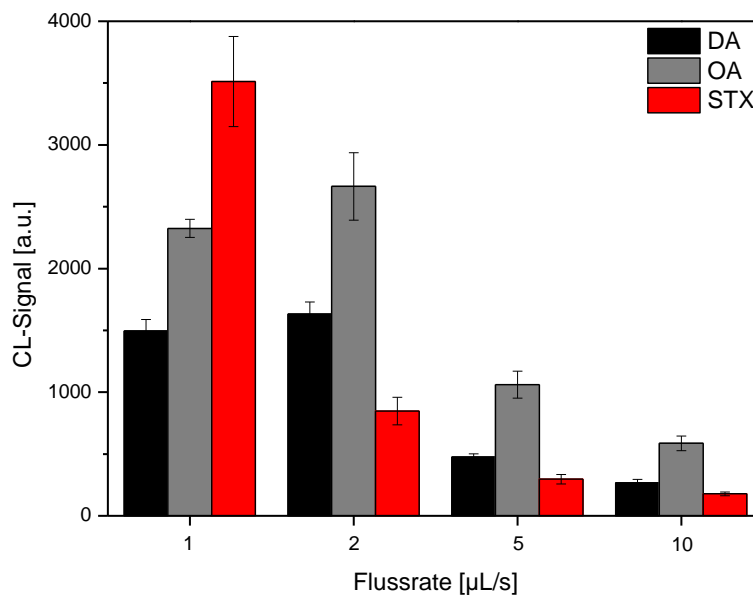
Tabelle 3.2: Abhängigkeit der Assay-Dauer von der Flussrate des primären Antikörpers.

Flussrate [$\mu\text{L/s}$]	Assay-Dauer [min]
1	25
2	17
5	13
10	11

Im Hinblick auf eine größere Anzahl von Messungen muss ein Kompromiss zwischen den hohen CL-Signalen und der Assay-Dauer gefunden werden. Für die weiteren Messungen wurde somit die Flussrate des primären Antikörpers auf $2 \mu\text{L/s}$ festgelegt, wodurch die CL-Signalintensität für jedes Muscheltoxin um den Faktor 2,5 gesteigert wurde.

3.1.5.2 Flussrate der Sekundärintikörper

Ebenso wurde der Einfluss der Flussrate des Sekundärintikörpers auf die CL-Signalintensitäten untersucht. Hierzu wurden auch Messungen bei $1 \mu\text{L/s}$, $2 \mu\text{L/s}$, $5 \mu\text{L/s}$ und $10 \mu\text{L/s}$ durchgeführt. Die Flussrate des Primärintikörpers betrug dabei $2 \mu\text{L/s}$. Für alle Phycotoxine ergab sich folgender Zusammenhang zwischen der Flussrate und der CL-Signalintensität (Abbildung 3.9).

**Abbildung 3.9:** Signalintensität in Abhängigkeit der Flussrate der Sekundärintikörper ($m = 5$, $n = 4$).

Auch für die verschiedenen Flussraten der Sekundärantikörper-Zugabe wurde die gleiche Tendenz wie für die Primärantikörper beobachtet. Je langsamer die Lösungen über den Mikroarray gepumpt wurden, desto höher waren die CL-Signale. Für DA und OA führten die Flussraten 1 $\mu\text{L/s}$ und 2 $\mu\text{L/s}$ zu ähnlich hohen CL-Signalintensitäten. Zudem gab es keinen Unterschied in der Assay-Dauer. Beide Flussraten führten zu einer Assay-Dauer von 26 min (siehe Tabelle 3.3). Dies wurde damit begründet, dass aufgrund des größeren Querschnitts der Sekundär- im Vergleich zur Primärantikörper-Spritze geringere Flussraten mechanisch nicht realisiert werden konnten. Im Gegensatz zu DA und OA wurde bei STX kein Plateau bei den Flussraten 1 $\mu\text{L/s}$ und 2 $\mu\text{L/s}$ erreicht. Für die Flussrate 2 $\mu\text{L/s}$ wurde verglichen mit 1 $\mu\text{L/s}$ ein deutlicher CL-Signalabfall um den Faktor 4 beobachtet. Da die Messungen der Flussraten 1 $\mu\text{L/s}$, 2 $\mu\text{L/s}$, 5 $\mu\text{L/s}$ und 10 $\mu\text{L/s}$ mit einem Mikroarray-Chip durchgeführt wurden, kann der deutliche CL-Signalabfall von STX durch den stärker auftretenden Regenerationseffekt erklärt werden (Beschreibung des Regenerationseffektes siehe Kapitel 3.1.6).

Tabelle 3.3: Abhängigkeit der Assay-Dauer von der Flussrate des sekundären Antikörpers.

Flussrate [$\mu\text{L/s}$]	Assay-Dauer [min]
1	26
2	26
5	20
10	19

Die Flussrate der sekundären Antikörper wurde auf 5 $\mu\text{L/s}$ festgelegt, was für jedes Phycotoxin eine Erhöhung der CL-Signalintensität um den Faktor 2 bedeutete. Die Assay-Dauer des optimierten Messprogramms betrug 20 min, wobei der Regenerationsschritt 5 min 30 s benötigte.

3.1.5.3 Konzentration der Primärantikörper

Da die verwendeten Antikörper-Stammlösungen in derselben Konzentration (1 g/L) vorlagen, wurden alle Primärantikörper in gleichen Verhältnissen in Puffer verdünnt. Anschließend wurden die Verdünnungen von 1:10000, 1:5000, 1:2500 und 1:1000 der primären Antikörper-Lösungen hinsichtlich der resultierenden maximalen CL-Signalintensitäten untersucht und sind graphisch in Abbildung 3.10 dargestellt.

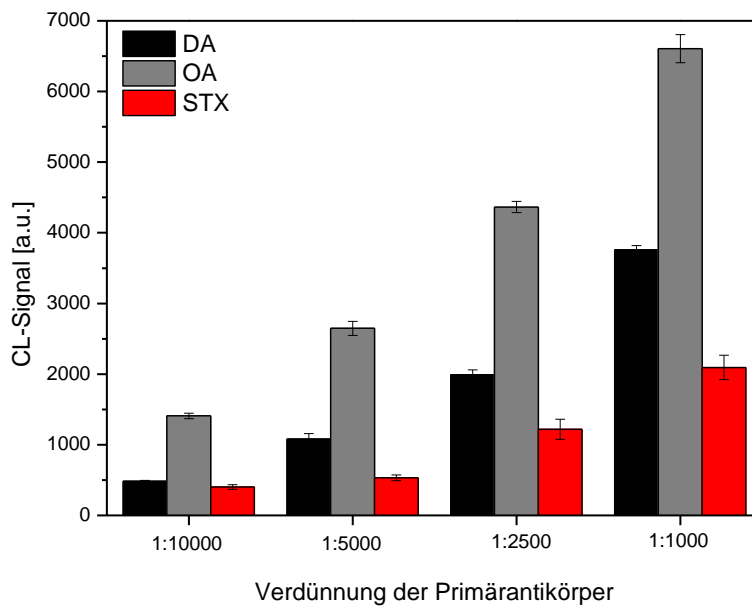


Abbildung 3.10: Signalintensität in Abhängigkeit der Verdünnung der Primärantikörper ($m = 5$, $n = 4$).

Die Variation der Antikörper-Konzentrationen zeigte für alle Phycotoxine denselben Trend. Mit einer geringeren Verdünnung bzw. einer höheren Konzentration der Primärantikörper ist ein signifikanter Signalanstieg verbunden. Bei einer höheren Konzentration stehen mehr Antikörper für eine Bindung an die Antigene auf der Chipoberfläche zur Verfügung. Im Vergleich zu anti-DA und anti-STX zeigte anti-OA die höchsten CL-Signalintensitäten. Dies könnte im Vergleich zu den anderen Antigen-Antikörper-Paaren auf eine besonders hohe Affinität von anti-OA zu seinem Antigen zurückzuführen sein. Die Realisierung höherer CL-Signalintensitäten ist jedoch gleichzeitig mit einem höheren Verbrauch an Antikörper-Stammlösung verbunden. Bei einem Bedarf von 10 mL-Antikörper-Lösung pro Messtag werden demnach 10 μ L Antikörper-Stammlösung benötigt (Tabelle 3.4). Folglich muss bei einer Konzentrationserhöhung der Antikörper abgewogen werden, wie viel Antikörper-Stammlösung verbraucht werden sollen und somit welche Kosten pro Assay entstehen. Für die weiteren Messungen wurde deswegen eine Verdünnung von 1:4000 (2,5 μ L bei 10 mL) gewählt, die einen Kompromiss zwischen ausreichend hohen CL-Signalen und geringem Antikörper-Verbrauch darstellt.

Tabelle 3.4: Abhängigkeit des Verbrauchs der Primärantikörper von der Verdünnung.

Verdünnung	1:10000	1:5000	1:2500	1:1000
Verbrauch (bei 10 mL)	1 μ L	2 μ L	4 μ L	10 μ L

3.1.5.4 Zusammenfassung

Abschließend wurde das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) vor und nach der Optimierung des Assay-Protokolls gemessen und berechnet. Vor der Optimierung lagen die SNR bei 7:1 für OA, 16:1 für DA und 48:1 für STX. Nach der Optimierung des Messprogramms waren die Signal-Rausch-Verhältnisse bei 24:1 für OA, 49:1 für DA und 98:1 für STX. Zusammengefasst führten alle Optimierungsschritte zu einer Erhöhung der CL-Signale mit einem Faktor von 3 für DA, 3,5 für OA und 2 für STX.

Die Konzentration der sekundären Antikörper wurde nicht variiert, da diese mit einer Verdünnung von 1:1000 (Konzentration: 1 mg/L) bereits im Überschuss vorlagen.

3.1.6 Untersuchung der Regenerierbarkeit

Mehrfachnutzungen eines Mikroarrays sind nur dann möglich, wenn nach der Regeneration erneut CL-Signale in den nachfolgenden Messungen erzeugt werden können. Als Regenerationspuffer wurde ein Glycin-Puffer bei pH 3 mit Zusatz von SDS (Glycin-SDS-HCl) verwendet. SDS wirkt denaturierend auf Proteine und begünstigt zusätzlich das Lösen der Bindung zwischen Antikörper und immobilisierten Toxinen. Um die Regenerierbarkeit zu untersuchen, wurden nach einem ganzen Messzyklus inklusive der Zugabe des Regenerationspuffers nur CL-Substrate über den Mikroarray geleitet. Nach Zugabe der Substrate zu einem bereits regenerierten Mikroarray wurden für alle Phycotoxine keine CL-Signale gemessen. Um zu gewährleisten, dass die Bindung zwischen Primärantikörper und Antigen getrennt und nicht lediglich das Enzym HRP inaktiviert wurde, wurde direkt nach Zugabe des Primärantikörpers Regenerationspuffer über den Chip geleitet. Nach der anschließenden Zugabe von Sekundärantikörpern und CL-Substraten wurden wiederum keine CL-Signale aufgenommen. Dies bestätigte eine vollständige Dissoziation der Antigen-Antikörper-Bindung, so dass die Mikroarray-Chips für mehrere Messungen verwendet werden können. Die Wiederverwendbarkeit der Mikroarrays wurde getestet, indem die maximalen CL-Signale für 25 Regenerationszyklen nur durch Zugabe der spezifischen

Antikörper der drei Phycotoxine erfasst wurden. Die maximalen CL-Signale der Phycotoxine in Abhängigkeit des Regenerationszyklus sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

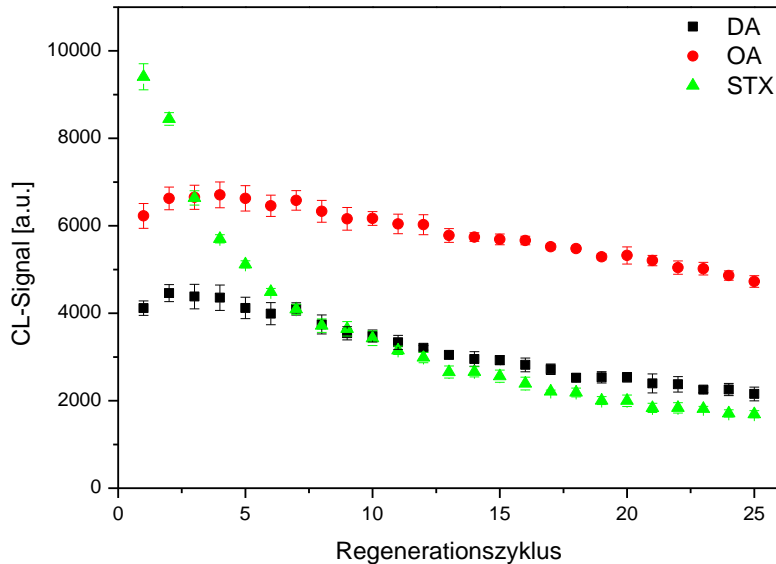


Abbildung 3.11: Regenerationsverlauf für DA (■), OA (●) und STX (▲) über 25 Zyklen ($m = 5$, $n = 25$).

Für alle Phycotoxine zeigten die Regenerationsmessungen einen Intensitätsrückgang der CL-Signale. Für DA und OA wurde eine lineare Abnahme der Signalintensität beobachtet, welche mit zwei unabhängigen Mikroarrays bestätigt wurde. Über die 25 Regenerationszyklen wurde der mittlere CL-Signalverlust berechnet. Für DA wurde eine Signalabnahme von $3,1 \pm 0,1\%$ pro Zyklus bestimmt, hingegen lag der mittlere Signalverlust von OA bei $1,5 \pm 0,1\%$. Verglichen mit DA und OA zeigte der Regenerationsverlauf von STX eine größere Abnahme der Signalintensität. In den ersten zehn Zyklen verlief die Regenerationskurve annähernd exponentiell, wobei sich der Signalverlust pro gemessenen Zyklus änderte. Die gesamte Abnahme der Signalintensität bzw. der Regenerationseffekt wurde durch Normierung der zuletzt gemessenen mit den ersten CL-Signalen für jedes Phycotoxin berechnet. Nach 25 Regenerationszyklen betragen die normierten Signalintensitäten $48,0 \pm 5,6\%$ für DA, $76,0 \pm 2,1\%$ für OA und $23,3 \pm 1,0\%$ für STX.

Ein Grund für die Abnahme der CL-Signale im Verlauf der Regeneration könnte darin liegen, dass nicht alle denaturierten Antikörper von den immobilisierten Toxinen entfernt wurden. Teile dieser Antikörper könnten weiterhin an den Toxinen gebunden sein und somit potentielle Bindungsstellen für weitere primäre Antikörper blockieren. Zudem könnten auch die Regenerationsbedingungen ein Ablösen der Phycotoxine von der Chipoberfläche

begünstigen. Da STX den stärksten Abfall der CL-Signalintensität zeigte, werden im Folgenden speziell für dieses Toxin verschiedene Regenerations- und Immobilisierungsstrategien untersucht.

3.1.7 Regenerations- und Immobilisierungsstrategien für Saxitoxin

Mit dem Ziel die Signalabnahme von STX zu minimieren, wurde der Einfluss verschiedener Regenerationspuffer sowie verschiedener Oberflächenbelegungen von Mikroarray-Chips auf die Regeneration von STX untersucht. Weiterhin wurden unterschiedliche kovalente Kopplungsansätze für STX an die chemisch-modifizierte Glasoberfläche getestet.

3.1.7.1 Regenerationspuffer

Zunächst wurden die Auswirkungen von verschiedenen basischen und sauren Puffern auf die Regeneration von STX untersucht. Die getesteten Puffer waren Glycin-SDS-HCl bei pH 3 [202], SDS-HCl bei pH 3 [181], Acetonitril mit 0,18 M NaOH [177] und Glycin-HCl mit 0,1% Tween20 bei pH 3 [234]. Für jeden Regenerationspuffer außer Glycin-Tween-HCl wurden 13 Zyklen gemessen (Abbildung 3.12).

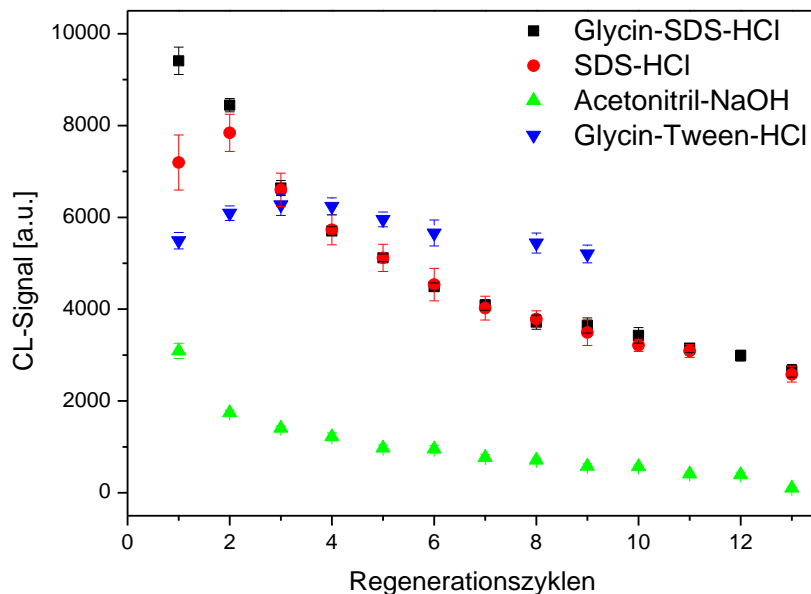


Abbildung 3.12: Untersuchung der Regenerierbarkeit von Saxitoxin mit verschiedenen Regenerationspuffern Glycin-SDS-HCl ($m = 5$, $n = 13$), SDS-HCl ($m = 5$, $n = 13$), Acetonitril-NaOH ($m = 5$, $n = 13$) und Glycin-Tween-HCl ($m = 5$, $n = 8$).

Bei Verwendung von Glycin-Tween fiel auf, dass die Regeneration von STX einen sehr flachen Abfall des CL-Signals zeigte. Nach 9 Zyklen betrug die normierten CL-Signale 82,9%. Jedoch konnten auch ohne die Zugabe von Antikörpern CL-Signale nach einem

gesamten Messzyklus detektiert werden. Somit bewirkte dieser Puffer keine Dissoziation der primären Antikörper von den Antigenen und war folglich für die Regeneration nicht geeignet. Ein Vergleich der Puffer von Glycin-Tween mit Glycin-SDS-HCl und SDS-HCl zeigte, dass der Zusatz SDS notwendig ist, um das Ablösen der Antikörper von den Antigenen zu begünstigen.

Im Gegensatz zu Glycin-Tween konnten bei den anderen getesteten Puffern bei Zugabe der CL-Substrate nach der Regeneration keine CL-Signale verzeichnet werden. Die normierten CL-Signale betragen 36,5% für Glycin-SDS-HCl, 39,4% für SDS-HCl und 18,5% für Acetonitril-NaOH. Aufgrund der starken Abnahme der CL-Signale wurde Acetonitril-NaOH als Regenerationspuffer ausgeschlossen. Ein Vergleich von Glycin-SDS-HCl und SDS-HCl zeigte, dass beide Regenerationskurven ab Zyklus 3 in Bezug auf die Intensität und Abnahme der CL-Signale ein identisches Verhalten zeigten. So konnte festgestellt werden, dass Glycin auf die Regeneration keinen Einfluss hat. Für die weiteren Regenerationsmessungen wurde SDS-HCl bei pH 3 verwendet.

3.1.7.2 Modifizierung der Glasoberflächen

Der Einfluss von verschiedenen Oberflächenmodifizierungen der Glasobjektträger wurde hinsichtlich der Spotform und -größe sowie des Regenerationsverhaltens untersucht. Säure- oder basenaktivierte Glasträger wurden mit dreidimensionalen Gelen wie den Dendrimeren (Kapitel 6.3.1.3), mit Poly-L-Lysin (Kapitel 6.3.1.2) oder mit Aminodextranen (Kapitel 6.3.1.4) belegt. Zum direkten Vergleich wurden Glasobjektträger zunächst silanisiert, mit DAPEG beschichtet und mit DiepoxyPEG aktiviert (Kapitel 6.3.1.1 und 6.3.2.1). Die Bindung von Antigenen an Dendrimer-Oberflächen sowie an Poly-L-Lysin erfolgt dabei über physikalische Adsorption [230, 235]. Bei Polyethylenglykol- und Aminodextran-Oberflächen erfolgt eine kovalente Bindung über verschiedene funktionelle Gruppen wie Carboxy-, Amino-, Thiol- oder Estergruppen [235-237]. Des Weiteren zeichnen sich PEG- und Aminodextran-Mikroarrays durch ihre geringen unspezifischen Bindungen und folglich durch ein geringes Hintergrundsignal aus [238].

Die Oberflächen wurden gemäß den Vorschriften [202, 239-241] hergestellt. Anschließend wurde STX direkt auf die modifizierten Glasoberflächen aufgetragen. Wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben, führt eine Immobilisierung von STX auf DiepoxyPEG-Oberflächen zu genau abgegrenzten und definierten Spotformen mit hohen Signalintensitäten. Im Vergleich dazu wurden für die Poly-L-Lysin-Oberfläche sehr geringe Signalintensitäten erhalten,

wodurch eine Regenerationsmessung mit dieser Oberflächenbeschichtung nicht möglich war. Die Dendrimer-Mikroarrays wiesen eine geringe Größe der Spots mit einer schwachen CL-Signalintensität auf. Mit den Aminodextran-Mikroarrays wurde keine homogene Verteilung von STX im Spot erzielt. In Abbildung 3.13 sind die CCD-Aufnahmen der verschiedenen Oberflächenmodifizierungen EpoxyPEG, Poly-L-Lysin, Dendrimere und Aminodextran abgebildet.

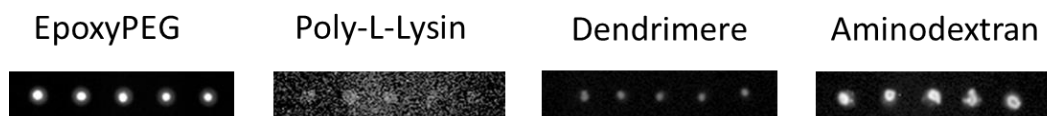


Abbildung 3.13: CCD-Aufnahmen der verschiedenen Oberflächenmodifizierungen EpoxyPEG, Poly-L-Lysin, Dendrimere und Aminodextran.

Die Hintergrundsignale lagen für die verschiedenen Oberflächenbelegungen in derselben Größenordnung zwischen 100 - 140 a.u. Nicht nur bezüglich der Spotform erwies sich die EpoxyPEG-Oberfläche als besonders geeignet, sondern zeigte zudem auch das höchste Signal-Rausch-Verhältnis (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Vergleich der Hintergrundsignale und Signal-Rausch-Verhältnisse (SNR) der verschiedenen Oberflächenmodifikationen.

Oberfläche	EpoxyPEG	Poly-L-Lysin	Dendrimere	Aminodextran
Hintergrund [a.u.]	110	108	107	139
SNR	26	1	20	17

Das Regenerationsverhalten von STX auf den drei modifizierten Oberflächen ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Die Regenerationsmessungen wurden unter identischen experimentellen Bedingungen durchgeführt, wobei als Regenerationspuffer SDS-HCl bei pH 3 verwendet wurde. Für die modifizierten Oberflächen wurde ein Signalabfall von 45,9% für EpoxyPEG, 38,6% für die Dendrimere und 26,4% für die Aminodextran-Oberfläche von dem ersten bis zehnten Zyklus gemessen. Folglich wurde nach 10 Regenerationszyklen der geringste Signalabfall für die EpoxyPEG-Oberfläche erreicht. Diese wurde demnach für die weiteren Messungen verwendet.

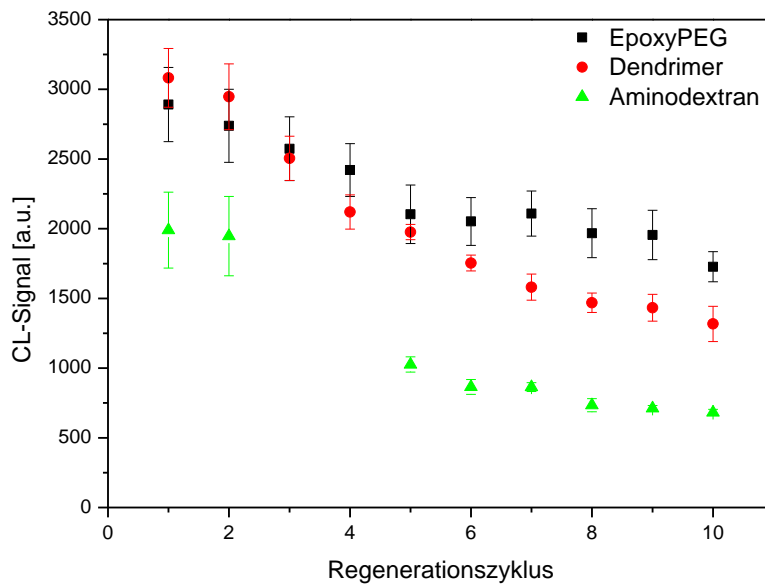


Abbildung 3.14: Vergleich der Regenerationszyklen der EpoxyPEG- ($m = 5$, $n = 10$), Dendrimer- ($m = 5$, $n = 10$), und Aminodextran-Mikroarrays ($m = 5$, $n = 8$).

Für die CL-Signalabnahme auf den getesteten Oberflächenmodifizierungen können Abwascheffekte von STX nicht ausgeschlossen werden. Die Immobilisierung von STX beruht demnach hauptsächlich auf adsorptiven Kräften und wird somit nicht durch eine kovalente Bindung erreicht. Aufgrund dessen werden im folgenden Kapitel 3.1.7.3 kovalente Immobilisierungsstrategien für STX untersucht.

3.1.7.3 Kovalente Kopplungsmethoden für STX

Um eventuelle Abwascheffekte zu minimieren, wurden verschiedene Kopplungsmethoden für eine kovalente Immobilisierung von STX auf der EpoxyPEG-Chipoberfläche untersucht. STX besitzt als funktionelle Gruppen eine Carbamatgruppe und ringgebundene sekundären Amine, die für eine kovalente Bindung nicht geeignet sind. Die Ansätze (siehe Abbildung 3.15.) für eine kovalente Kopplung an die EpoxyPEG-modifizierte Oberfläche basieren somit auf der Aktivierung der Carbamatgruppe.

In der Literatur wird die Aktivierung von Saxitoxin zur Kopplung an Oberflächen über Formaldehyd [180] und an Enzyme über Natriumperiodat [242] beschrieben.

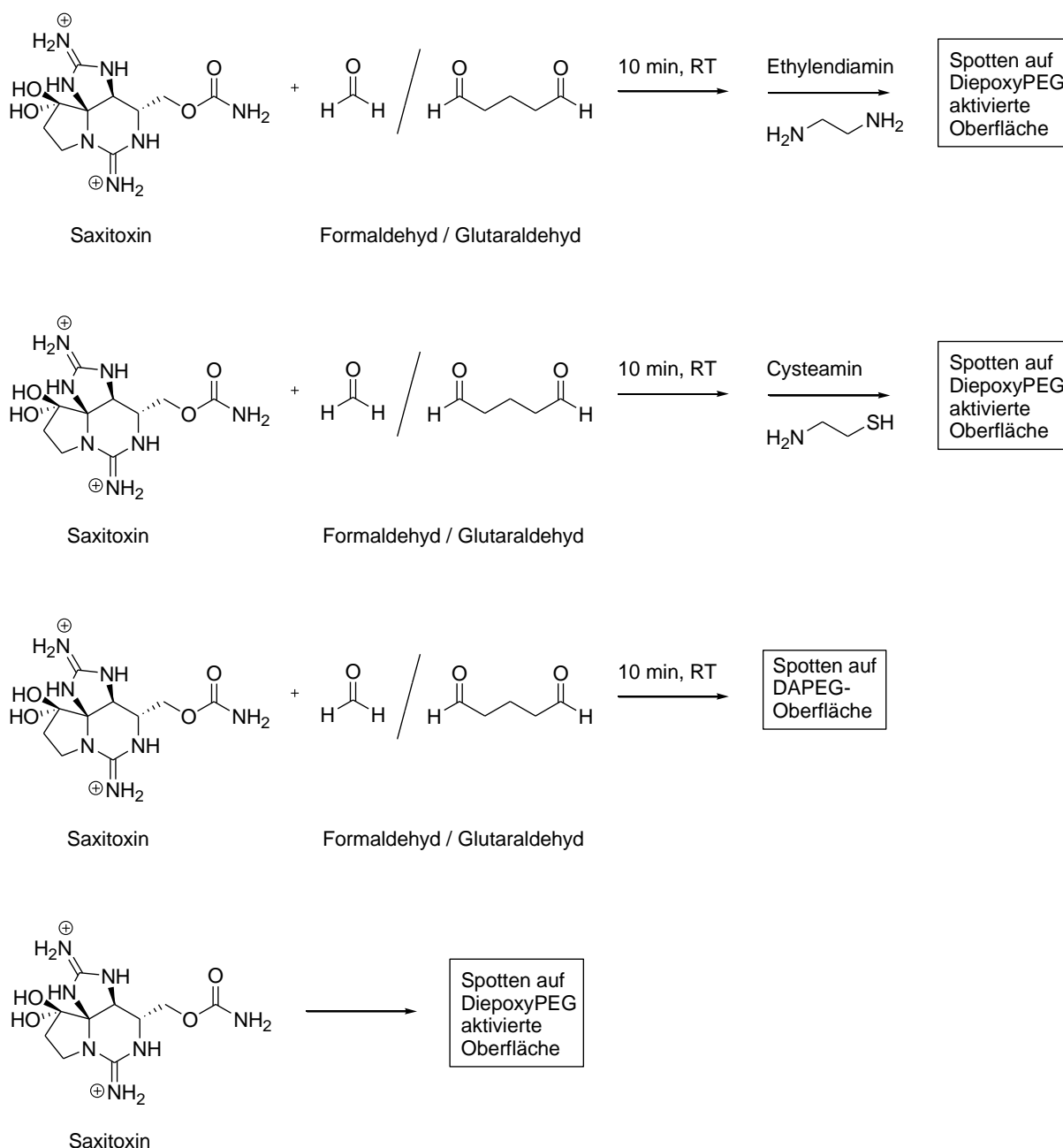


Abbildung 3.15: Verschiedene kovalente Kopplungsmethoden für STX.

Um die Carbamatgruppe zu aktivieren, wurde STX für jeweils 10 min mit Formaldehyd bzw. mit Glutaraldehyd bei Raumtemperatur inkubiert. Die resultierenden endständigen Aldehyd-Gruppen sollten mithilfe von Ethylendiamin oder Cysteamin an die endständigen Epoxid-Gruppen der PEG-aktivierten Chipoberfläche gebunden werden. Zudem wurde eine direkte Kopplung von Formaldehyd- bzw. Glutaraldehyd-aktiviertem STX mit den endständigen Aminogruppen der DAPEG-Oberfläche untersucht. Diese Kopplungsmethoden wurden mit der direkten Auftragung von STX auf die EpoxyPEG-Oberfläche verglichen. Mit allen in Abbildung 3.15 dargestellten Methoden konnten Messsignale (siehe Abbildung 3.16) erhalten werden. Die verschiedenen Zusätze zeigten keinen Einfluss auf die Spotformen sowie deren

Homogenität. Für alle Varianten wurden scharf abgrenzte Spots erhalten. Die Verwendung von Glutaraldehyd führte zu anfänglich erhöhten Signal-Hintergrund-Verhältnissen (SBR, *signal-to-background ratio*). Im Verlauf der Regeneration zeigte sich jedoch ein stärkerer Signalabfall auf ca. 20%. Im Vergleich zu der direkten Auftragung von STX führte keine der untersuchten Immobilisierungsstrategien zu einer Verringerung des Signalabfalls. Das prozentuale Restsignal betrug nach 10 Regenerationszyklen 33,2% für STX ohne Aktivierung. Für die weiteren Messungen wurde deswegen STX direkt ohne die Zugabe von Kopplungsreagenzien auf die EpoxyPEG-Oberflächen gespottet.

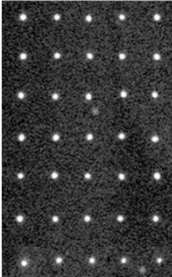
		SBR	Prozentuales Restsignal nach 10 Regenerationen
STX + Formaldehyd + Ethylendiamin		25	25,6%
STX + Formaldehyd + Cysteamin		27	25,4%
STX + Formaldehyd		22	19,1%
STX + Glutaraldehyd + Ethylendiamin		33	21,4%
STX + Glutaraldehyd + Cysteamin		33	17,8%
STX + Glutaraldehyd		36	19,2%
STX		21	33,2%

Abbildung 3.16: CCD-Aufnahme der verschiedenen Kopplungsmöglichkeiten.

3.1.7.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die EpoxyPEG-Oberfläche die besten Eigenschaften bezüglich der Spotform und Spothomogenität aufwies. Als Regenerationspuffer wurde SDS-HCl bei pH 3 gewählt. Um Abwascheffekte als Grund für die CL-Signalabnahme auszuschließen, wurden verschiedene kovalente Immobilisierungsstrategien für STX untersucht. Jedoch zeigte sich im unmittelbaren Vergleich, dass die direkte Auftragung von STX auf die EpoxyPEG-Oberfläche die geringste CL-Signalabnahme aufwies.

Eine Veränderung des Regenerationsverlaufs könnte beispielsweise auch durch die Einführung von Linkern [243] oder durch weitere Derivatisierung [244] erreicht werden. Die Carbamatgruppe könnte beispielweise durch Erhitzen mit Salzsäure bei 100°C in eine reaktivere primäre Alkoholgruppe reduziert werden [245]. Da jedoch der STX-Standard nur in kleinen Mengen (100 µL) mit einer Konzentration von 100 µg/L zur Verfügung stand, war keine Derivatisierung von STX möglich, um eine verbesserte Bindung oder Adsorption an die EpoxyPEG-aktivierte Oberfläche zu erreichen und folglich eine stabilere Regeneration in den ersten zehn Zyklen zu erhalten.

Eine weitere Möglichkeit, um eine kovalente Bindung von Phycotoxinen auf Chipoberflächen zu erreichen, ist eine Modifizierung der Chipoberfläche, die speziell für ein bestimmtes Phycotoxin ausgerichtet ist [194]. Für Messungen auf der Durchfluss-Analyse-Plattform MCR3 ist es allerdings nicht möglich die Oberfläche speziell für jedes Phycotoxin anzupassen, da alle Phycotoxine auf demselben Mikroarray immobilisiert werden. Als einheitliche Lösung werden somit alle Phycotoxine direkt auf die EpoxyPEG-aktivierten Chipoberflächen ohne weitere Aktivierung aufgetragen.

3.1.8 Messstrategie

Trotz der vorhandenen CL-Signalabnahme kann neben einer qualitativen Bestimmung der Phycotoxine auch eine Quantifizierung der Toxinkonzentration mit wiederverwendbaren Mikroarray-Chips ermöglicht werden, da nach 25 Regenerationszyklen noch ausreichend hohe CL-Signale zur Auswertung verbleiben (siehe Kapitel 3.1.6). Folglich wurden die Auswirkungen, die die direkte Immobilisierungsstrategie und demzufolge der Regenerationseffekt auf Kalibrierkurven und Wiederfindungsraten hat, untersucht. Hierfür wurde zunächst eine definierte Messstrategie etabliert. Die Messstrategie wurde auf alle Toxin-Mikroarrays angewandt und beinhaltete eine genaue Abfolge der Messungen, einschließlich der Blank-, Kalibrier- und Wiederfindungsmessungen (siehe Abbildung 3.17). Jeweils die ersten zwei Blankmessungen wurden bei jeder Messabfolge nicht berücksichtigt, um eine vollständige Beladung der Reagenzien im System zu gewährleisten. Der Einfluss einer unvollständigen Beladung ist durch eine leichte Zunahme der CL-Signalintensität in den ersten drei Regenerationszyklen in Abbildung 3.17 ersichtlich. Die dritte Blankmessung wurde zugleich als Messung des 0- $\mu\text{g/L}$ -Kalibrierstandards verwendet. Die weiteren Kalibrierstandards 0,01 – 500 $\mu\text{g/L}$ bzw. 1000 $\mu\text{g/L}$ wurden anschließend in aufsteigender Konzentration gemessen. Die höchste gemessene Konzentration wurde dabei durch die Konzentration des jeweiligen Phycotoxin-Standards vorgegeben. Nach jeder Kalibrierung wurden zwei weitere Blank-Messungen aufgenommen, um Verschleppungen der zuletzt gemessenen hohen Phycotoxin-Konzentrationen (100, 500 und 1000 $\mu\text{g/L}$) im Durchflusssystem zu verhindern und somit die anschließende Analyse der Proben nicht zu verfälschen. Wie in Abbildung 3.17 ersichtlich, waren die beiden Blankmessungen im Anschluss an die Kalibrierung notwendig, da ein Signalanstieg für die fünfte Blankmessung von DA und OA verzeichnet wurde. Für STX blieb das CL-Signal auf dem gleichen Niveau, da bereits bei der

fünftens Blankmessung der Regenerationseffekt zum Tragen kam. Anschließend erfolgte alternierend eine Probemessung gefolgt von einer Blankmessung.

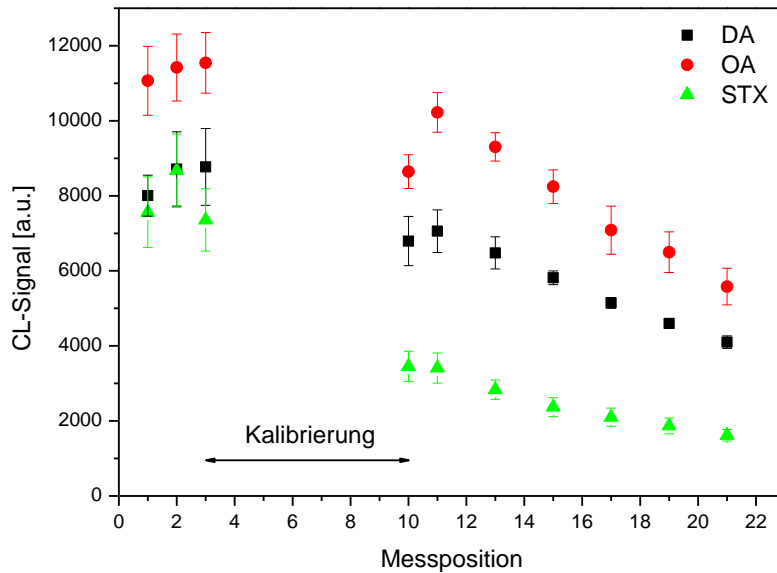


Abbildung 3.17: Darstellung der Messstrategie bzw. Ablauf der Messungen für DA (■), OA (●) und STX (▲); Zyklen (1 – 3, 11, 13, 15, 17, 19, 21) sind Blankmessungen, Zyklus 3 ist gleichzeitig der erste Kalibrierpunkt (0 µg/L) und in den Zyklen (4 - 9) wurde die Kalibrierung durchgeführt (m = 5, n = 21).

3.1.9 Einzel- und Multiplex-Kalibrierung

Unter Verwendung der definierten Messstrategie und des optimierten Messprogramms wurden Kalibrierungen von Phycotoxinen auf der Durchfluss-Mikroarray-Plattform MCR3 durchgeführt. Durch halblogarithmische Auftragung der CL-Signale gegen die gemessenen Konzentrationen wurden Kalibrierkurven für DA, OA und STX erhalten, welche in Abbildung 3.18 repräsentativ dargestellt sind.

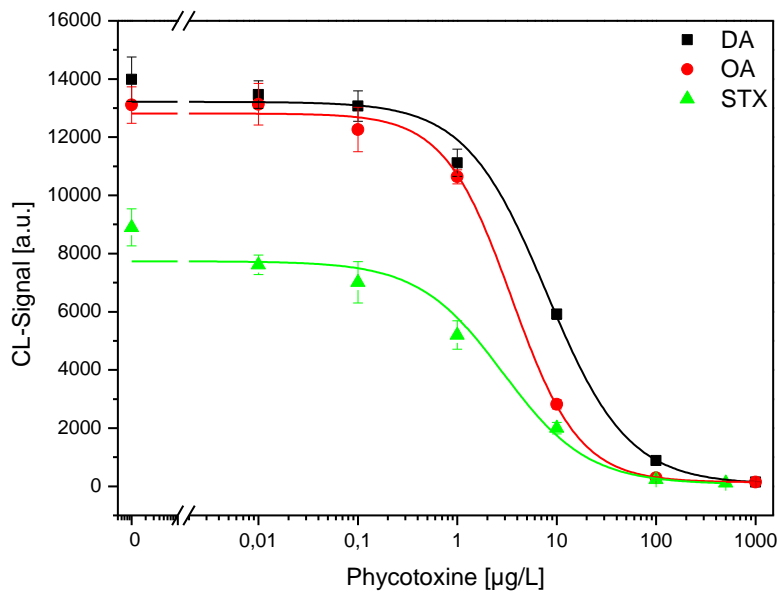


Abbildung 3.18: Kalibrierkurven ($m = 5$, $n = 7$) von DA (■), OA (●) und STX (▲).

Die Kalibrierungen wurden zunächst für jedes Phycotoxin einzeln durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine parallele Zugabe von Phycotoxinen einen Einfluss auf die Messungen hat. Für die Einzelkalibrierungen der Phycotoxine wurden folgende Ergebnisse auf einem Mikroarray-Chip ($m = 5$, $n = 7$) erhalten, wobei m die Anzahl der Messpunkte angibt und n für die Anzahl der Messungen steht. Die Chip-internen Nachweisgrenzen wurden zu $1,4 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$ für DA, $0,6 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$ für OA und $0,5 \pm 0,3 \mu\text{g/L}$ für STX berechnet. Die Arbeitsbereiche (WR) sind als Intervalle von 20 bis 80% der maximalen CL-Signale definiert und waren $2,3 \pm 0,2 - 29,8 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$ für DA, $1,3 \pm 0,2 - 11,1 \pm 0,3 \mu\text{g/L}$ für OA und $0,8 \pm 0,1 - 12,6 \pm 0,8 \mu\text{g/L}$ für STX. Für den Testmittelpunkt (IC_{50}) wurden $8,2 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$ (DA), $3,7 \pm 0,3 \mu\text{g/L}$ (OA) und $3,1 \pm 0,3 \mu\text{g/L}$ (STX) erhalten. Die geringen Abweichungen der Kalibrierdaten aller Einzelkalibrierungen zeigten die Qualität der Mikroarray-Chips, da diese aus den Abweichungen der fünf gespotteten Replikate bestimmt wurden.

Für die Kalibrierdaten der Multiplex-Messungen der Phycotoxine wurden drei Kalibrierkurven gemittelt. In den Standardabweichungen der Multiplex-Messungen sind somit Variationen bedingt durch die Verwendung verschiedener Mikroarray-Chips und der unterschiedlichen Bedingungen an den jeweiligen Messtagen berücksichtigt. Die LODs entsprachen $1,2 \pm 0,6 \mu\text{g/L}$ für DA, $1,3 \pm 0,5 \mu\text{g/L}$ für OA und $1,0 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$ für STX. Für die Arbeitsbereiche wurden $1,3 \pm 0,4 - 36,4 \pm 2,1 \mu\text{g/L}$ (DA), $1,4 \pm 0,2 - 8,6 \pm 2,1 \mu\text{g/L}$ (OA) und $0,6 \pm 0,1 - 12,4 \pm 1,2 \mu\text{g/L}$ (STX) und für die IC_{50} -Werte $7,3 \pm 0,6 \mu\text{g/L}$ (DA), $3,4 \pm 0,3 \mu\text{g/L}$ (OA) und $2,7 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$ (STX) berechnet. Der Vergleich der Kalibrierdaten der

Einzel- und Multiplex-Messungen zeigte eine gute Übereinstimmung der berechneten Daten, wobei diese in einem ähnlichen Konzentrationsbereich lagen. Die Anwesenheit weiterer Phycotoxine beeinflusste somit nicht die Messergebnisse, so dass eine parallele Kalibrierung verschiedener Phycotoxine möglich war. Die geringen Abweichungen der Kalibrierdaten können auf verschiedenen Ursachen wie z.B. der Oberflächenchemie, Spottingverfahren oder Temperaturdifferenzen beruhen. In Tabelle 3.6 sind die Kalibrierdaten der Einzel- und Multiplex-Messungen in PBS-Puffer zusammengefasst.

Tabelle 3.6: Kalibrierdaten der Einzel- und Multiplex-Messungen der Phycotoxine (m = 5, n = 7).

Einzel-Messungen

Toxin	IC₅₀ [µg/L]	WR (20 – 80%) [µg/L]	LOD [µg/L]
Domoinsäure	8,2 ± 0,2	2,3 ± 0,2 – 29,8 ± 0,2	1,4 ± 0,4
Okadasäure	3,7 ± 0,3	1,3 ± 0,2 – 11,1 ± 0,3	0,6 ± 0,2
Saxitoxin	3,1 ± 0,3	0,8 ± 0,1 – 12,6 ± 0,8	0,5 ± 0,3

Multiplex-Messungen

Toxin	IC₅₀ [µg/L]	WR (20 – 80%) [µg/L]	LOD [µg/L]	CV [%]
Domoinsäure	7,3 ± 0,6	1,3 ± 0,4 – 36,4 ± 2,1	1,2 ± 0,6	8,4
Okadasäure	3,4 ± 0,3	1,4 ± 0,2 – 8,6 ± 2,1	1,3 ± 0,5	8,9
Saxitoxin	2,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1 – 12,4 ± 1,2	1,0 ± 0,2	4,9

Um die Reproduzierbarkeit der Kalibrierkurven zu zeigen, wurde für jedes Phycotoxin der Variationskoeffizient (CV) aus den Mittelwerten der IC₅₀-Werte der drei Multiplex-Kalibrierkurven berechnet. Für jedes Phycotoxin wurden geringe Variationskoeffizienten (<10%) erhalten, die die gute Reproduzierbarkeit der Kalibrierungen auf verschiedenen Mikroarray-Chips und an verschiedenen Tagen bestätigen. Die normierten Multiplex-Kalibrierungen für jedes Phycotoxin sind in den Abbildungen 3.19 – 3.21 dargestellt.

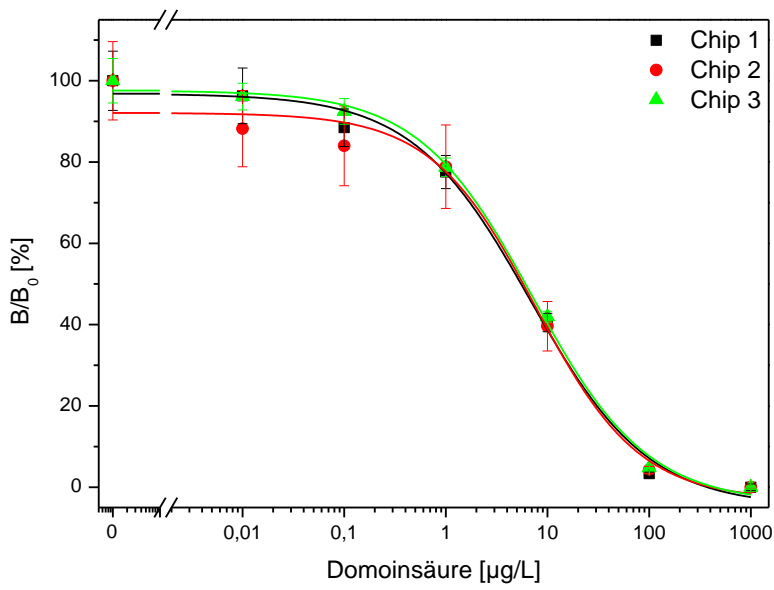


Abbildung 3.19: Multiplex-Kalibrierkurven von DA ($m = 5$, $n = 7$).

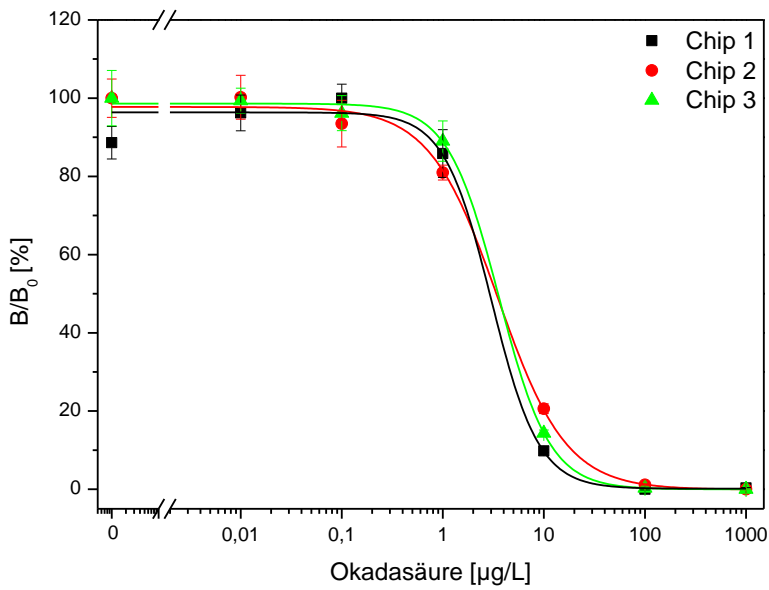


Abbildung 3.20: Multiplex-Kalibrierkurven von OA ($m = 5$, $n = 7$).

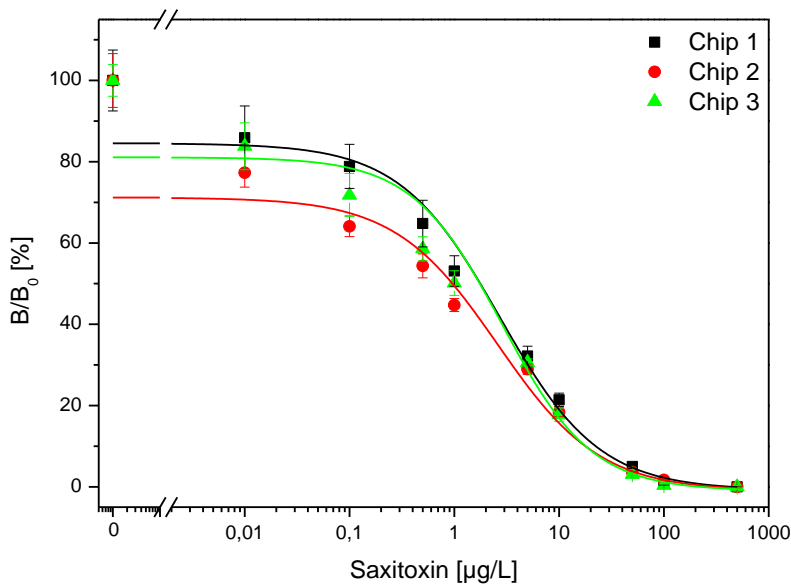


Abbildung 3.21: Multiplex-Kalibrierkurven von STX ($m = 5$, $n = 10$).

Interne Kalibrierungen bieten zudem den Vorteil, dass Variationen in der CL-Signalintensität bedingt durch die Verwendung verschiedener Mikroarray-Chips für jeden Kalibrierstandard bzw. Probenmessung ausgeschlossen werden können. Darüber hinaus ist die Herstellung und Verwendung eines Mikroarray-Chips für eine ganze Messperiode mit geringeren Kosten verbunden.

3.1.10 Wiederfindung

3.1.10.1 Korrekturmethode

Für die Bestimmung der Wiederfindungsraten der drei Phycotoxine wurde eine Probe mit $5 \mu\text{g/L}$ DA, $3 \mu\text{g/L}$ OA und $2,5 \mu\text{g/L}$ STX in PBS-Puffer verwendet. Diese Konzentrationen wurden gewählt, da sie im sensitivsten Bereich der Kalibrierkurven in der Nähe der Testmittelpunkte liegen. Die mit den Toxinen versetzte Probe wurde anhand der definierten Messstrategie (siehe Kapitel 3.1.8) mit einem Mikroarray-Chip analysiert. Insgesamt wurde die Probe viermal gemessen und anschließend die Wiederfindungsrate bestimmt, bei der es sich um das prozentuale Verhältnis der experimentell bestimmten Konzentration zum exakt dotierten Wert handelte. Die berechneten Wiederfindungen aus den vier Messungen resultierten in gemittelten Werten von $22,4 \mu\text{g/L} \pm 15,0 \mu\text{g/L}$ (448,2%) für DA, $6,5 \pm 2,0 \mu\text{g/L}$ (216,1%) für OA und $11,6 \pm 5,2 \mu\text{g/L}$ (462,3%) für STX (Tabelle 3.8).

Für jedes der drei Phycotoxine kam es zu einer Überbestimmung in der Wiederfindung von mehr als 200%, die durch den CL-Signalabfall in der Regeneration verursacht wird. Um eine präzise Bestimmung der Wiederfindungen der Proben zu ermöglichen, wurden zwei unterschiedliche Korrekturmodelle untersucht, die es erlauben den Regenerationseffekt mathematisch zu korrigieren. Im Folgenden werden die zwei möglichen mathematischen Korrekturmodelle vorgestellt.

Korrekturmethode I

Für die Korrekturmethode I wurden die erhaltenen CL-Signale der Probenmessungen mithilfe der Gleichung 15 (siehe Experimententeil) korrigiert. Als CL_{Blank} wurde die dritte Blankmessung (0 $\mu\text{g/L}$ -Kalibrierstandard) verwendet. Im Gegensatz zu CL_{Blank} ist CL_{Referenz} eine variable Größe. Für CL_{Referenz} wurde immer die Blankmessung eingesetzt, die unmittelbar vor jeder Probe gemessen wurde. Die so korrigierten CL-Signale sind in Abbildung 3.22 in den Kurvenverläufen der Kalibrierungen graphisch dargestellt.

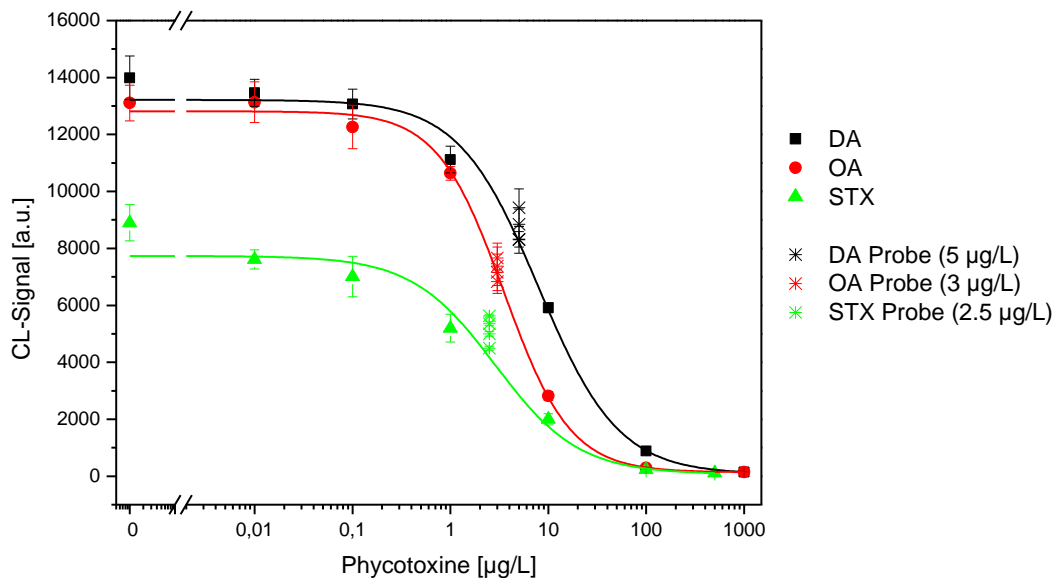


Abbildung 3.22: Korrektur der Wiederfindungsraten mit Korrekturmethode I ($m = 5$, $n = 8$).

Die berechneten Mittelwerte der Wiederfindungen waren $4,3 \pm 0,7 \mu\text{g/L}$ (86,2%) für DA, $3,1 \pm 0,3 \mu\text{g/L}$ (102,5%) für OA und $1,5 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$ (61,6%) für STX (exakte Werte siehe Tabelle 3.8). Das Korrekturverfahren I führte demnach zu verlässlichen Wiederfindungsraten für DA und OA. Bedingt durch die lineare Korrelation zwischen Regenerationszyklus und CL-Signalabnahme wurden für Immunoassays akzeptable Abweichungen zu einer Wiederfindung von 100% erzielt. Hingegen wurde mit dieser Korrekturmethode eine Unterbestimmung für STX erhalten. Die geringeren Wiederfindungsraten von STX können durch den CL-

Signalverlust in der Regeneration erklärt werden, welcher in den ersten zehn Zyklen einen exponentiellen Zusammenhang zeigte (siehe Abbildung 3.11). Durch die Anwendung der Korrekturmethode I konnte somit nicht jedes Phycotoxin zu Wiederfindungen um 100% korrigiert werden. Dennoch stellt diese Methode ein einfach anwendbares Korrekturverfahren dar.

Korrekturmethode II

Für die Korrekturmethode II wurde die Tatsache genutzt, dass die CL-Signale der Blankmessungen für DA und OA beginnend mit Messzyklus 11 eine konstante lineare Abnahme zeigten. Nur diese Blankmessungen wurden für die Erstellung einer linearen Fitfunktion nach der Gleichung 16 (siehe Experimentalteil) in Betracht gezogen. Die resultierenden Geradengleichungen sind in Abbildung 3.23 dargestellt. Mithilfe der Steigung und des y-Achsenabschnittes der Geradengleichungen wurde für jeden Messzyklus ein Korrekturfaktor berechnet.

Für die exponentielle CL-Signalabnahme von STX wurden neben den Blankmessungen ab dem 11. Zyklus auch die ersten Blankmessungen für die Fitfunktion verwendet (Gleichung 17). Alle Blankmessungen wurden unter Verwendung eines exponentiellen Abfalls 1. Ordnung als Modellfunktion gefittet. Die resultierende Gleichung für STX ist in Abbildung 3.23 beschrieben. Durch die Anwendung der Gleichung auf jede Messposition, wurde auch hier ein Korrekturfaktor für jeden Messzyklus von STX berechnet.

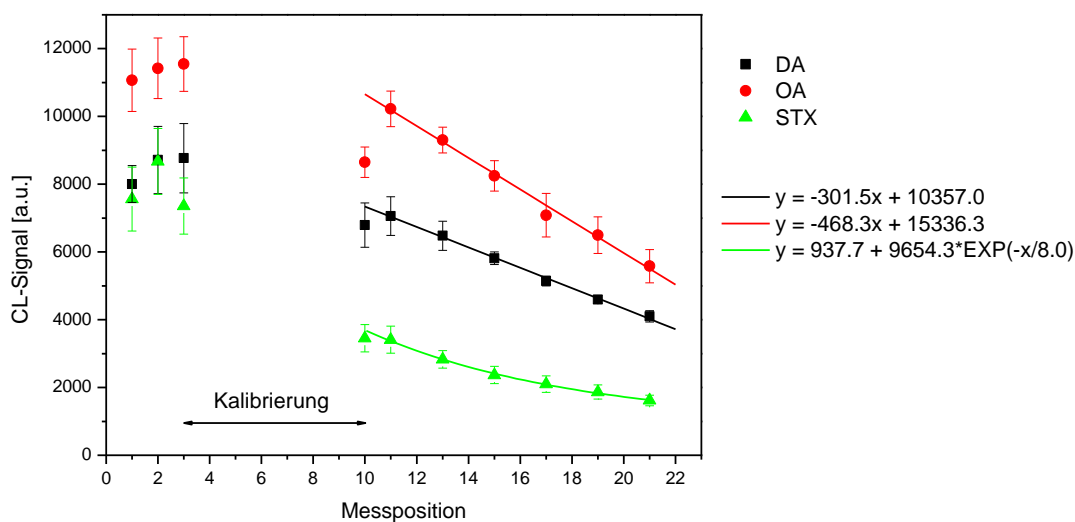


Abbildung 3.23: Darstellung der Fitfunktionen mit zugehörigen Gleichungen ($m = 5$, $n = 21$).

Unter Verwendung der Korrekturfaktoren wurden alle gemessenen CL-Signale der Kalibrierung, Proben- und Blankmessungen korrigiert. Der CL-Signalabfall in der Kalibrierung wurde korrigiert, so dass für jedes Phycotoxin stabile obere Asymptoten erhalten wurden. Die korrigierten CL-Signale der Kalibrierungen sowie der Probenmessungen sind in Abbildung 3.24 dargestellt.

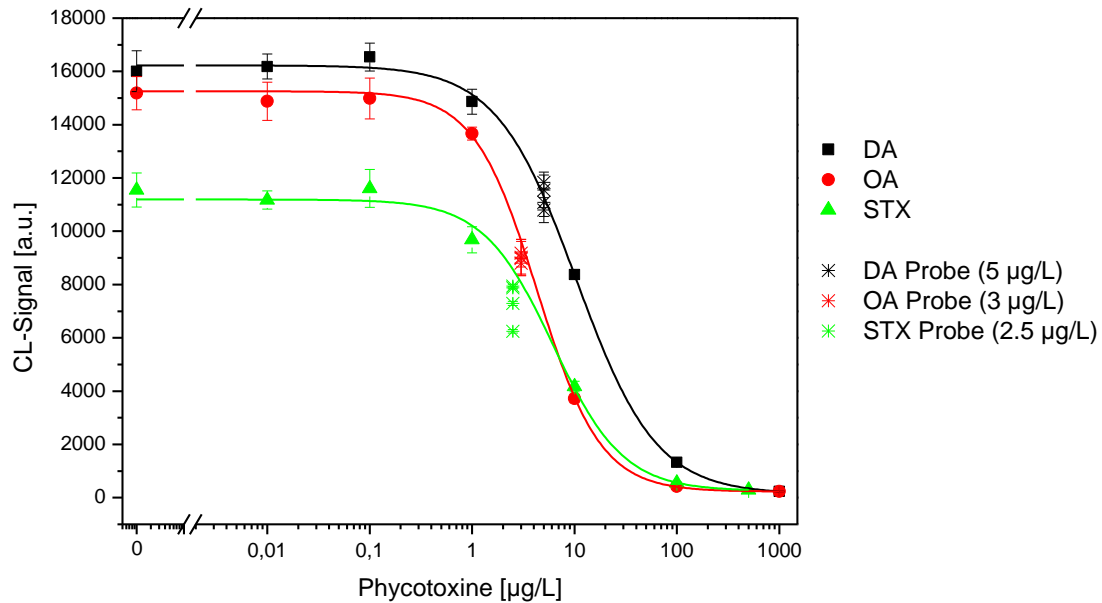


Abbildung 3.24: Korrektur der Wiederfindungsraten über Korrekturfaktoren ($m = 5$, $n = 8$).

Wie aus Abbildung 3.11 ersichtlich ist, setzt der Regenerationseffekt ab der dritten bis vierten Messung für DA und OA ein bzw. schon ab der ersten Messung für STX. Demnach müssten neben den Wiederfindungsraten auch alle Kalibrierpunkte korrigiert werden. Allerdings besteht bei Korrekturmethode I keine Möglichkeit die Kalibrierungen zu korrigieren. Abweichend von den gemessenen Regenerationsprofilen ergeben sich in den Kalibrierungen jedoch obere Asymptoten für alle Phycotoxine, so dass für DA und OA gute Wiederfindungen erreicht werden. Für STX besitzt der exponentielle CL-Signalabfall einen größeren Einfluss, so dass hier niedrigere Wiederfindungen erzielt wurden. Im Gegensatz zu Korrekturmethode I wird mit der Methode II die Korrektur der Kalibrierung bereits berücksichtigt. Ein Vergleich der CL-Signalintensitäten der Kalibrierstandards aus Abbildung 3.22, die nicht mit der Korrekturmethode I korrigiert wurden, mit den Kalibrierstandards aus Abbildung 3.24, die über die Korrekturmethode II korrigiert wurden, zeigte, dass die CL-Signalintensitäten aller korrigierten Kalibrierstandards eine höhere Übereinstimmung mit den sigmoidalen Kurvenverläufen aufwiesen. Dies wurde über die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes

bestätigt, da für die korrigierten Kalibrierkurven höhere Werte für das Bestimmtheitsmaß erreicht wurden (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Bestimmtheitsmaß der nicht korrigierten und korrigierten Kalibrierkurven ($m = 5$, $n = 8$).

Bestimmtheitsmaß R^2	Nicht korrigierte Kalibrierkurven	Korrigierte Kalibrierkurven
Domainsäure	0,99872	0,99983
Okadasäure	0,99966	0,99983
Saxitoxin	0,99917	0,99912

Durch die Anwendung der Korrekturmethode II wurden für die Wiederfindung folgende gemittelte Werte $5,0 \pm 0,6 \mu\text{g/L}$ (99,9%) für DA, $3,5 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$ (115,1%) für OA und $3,9 \pm 1,0 \mu\text{g/L}$ (155,8%) für STX erhalten. Ähnlich wie bei dem Korrekturverfahren I lag die Wiederfindung für DA und OA um 100%. Für STX wurde die Überbestimmung von 462,3% ohne mathematische Korrektur auf 155,8% reduziert.

Die Vorteile des Korrekturverfahrens II liegen zum einen darin, dass alle gemessenen CL-Signale korrigierbar sind und zum anderen, dass die Bestimmung der Wiederfindung der Proben unabhängig von der Schwankung der vorherigen Blankmessung ist. Zudem bietet diese Korrekturmethode die Möglichkeit Blankmessungen einzusparen und folglich Messzeiten und Kosten des Toxin-Mikroarrays zu senken. In weiteren Studien sollte herausgefunden werden, ob eine Reduktion von Blankmessungen möglich ist bzw. an welchen Messpositionen Blankmessungen stattfinden müssen, um die minimale Anzahl an erforderlichen Blankmessungen im Messablauf zu bestimmen, die für die Berechnung der Korrekturfaktoren nötig ist.

Mithilfe der Tabelle 3.8 kann zusammenfassend festgestellt werden, dass beide Korrekturverfahren I und II zu verlässlichen Resultaten in der Wiederfindung für DA und OA führten. Für die Bestimmung der Wiederfindungsraten von STX wurde mit der Korrekturmethode I eine Unterbestimmung erhalten, hingegen führte die Verwendung der zweiten Methode zu einer Überbestimmung.

Die geringen Standardabweichungen der gemittelten Wiederfindungsrate beider Korrekturverfahren bewiesen, dass die Phycotoxin-Konzentration einer Probe auch in weiteren Messungen exakt bestimmt werden kann. Folglich wird die Bestimmung der Proben nicht durch die Messposition beeinflusst und die Wiederfindungen hängen somit nicht vom Regenerationszyklus ab.

Tabelle 3.8: Wiederfindungsraten für DA, OA und STX ohne mathematische Korrekturen (linke Spalte), korrigiert mithilfe von Korrekturmethode I (mittlere Spalte) und Korrekturmethode II (rechte Spalte).

Eingesetzte Menge	Wiederfindung von DA ohne mathematische Korrektur		Wiederfindung von DA korrigiert mit Methode I		Wiederfindung von DA korrigiert mit Methode II	
	[µg/L]	[%]	[µg/L]	[%]	[µg/L]	[%]
5	10,3	205,9	3,4	67,8	4,7	93,5
5	14,6	292,8	4,1	82,2	5,3	105,8
5	20,8	415,0	4,9	97,6	5,7	113,8
5	44,0	879,0	4,9	97,1	4,3	86,4
Mittelwert	22,4 ± 15,0	448,2 ± 299,8	4,3 ± 0,7	86,2 ± 14,2	5,0 ± 0,6	99,9 ± 12,3

Eingesetzte Menge	Wiederfindung von OA ohne mathematische Korrektur		Wiederfindung von OA korrigiert mit Methode I		Wiederfindung von OA korrigiert mit Methode II	
	[µg/L]	[%]	[µg/L]	[%]	[µg/L]	[%]
3	4,7	157,6	3,0	99,5	3,4	114,4
3	5,5	184,1	3,1	104,8	3,5	115,5
3	6,3	209,5	2,8	92,7	3,3	110,9
3	9,4	313,2	3,4	113,2	3,6	119,4
Mittelwert	6,5 ± 2,0	216,1 ± 68,1	3,1 ± 0,3	102,5 ± 8,7	3,5 ± 0,1	115,1 ± 3,5

Eingesetzte Menge	Wiederfindung von STX ohne mathematische Korrektur		Wiederfindung von STX korrigiert mit Methode I		Wiederfindung von STX korrigiert mit Methode II	
	[µg/L]	[%]	[µg/L]	[%]	[µg/L]	[%]
2,5	7,0	279,0	1,1	44,4	3,2	128,8
2,5	9,7	389,5	1,6	64,6	3,9	155,6
2,5	10,6	422,6	1,3	52,7	3,1	125,9
2,5	19,0	758,3	2,1	84,5	5,3	212,8
Mittelwert	11,6 ± 5,2	462,3 ± 206,6	1,5 ± 0,4	61,6 ± 17,4	3,9 ± 1,0	155,8 ± 40,3

3.1.10.2 Anwendbarkeit der Korrekturmethode

Die Anwendbarkeit beider Korrekturverfahren I und II wurde durch weitere Messungen von Proben mit verschiedenen Phycotoxin-Konzentrationen überprüft. Die Konzentration der Proben waren 2, 5 und 15 µg/L, wobei die mit 5 µg/L dotierte Probe jeweils zweimal bestimmt wurde. Die exakten Wiederfindungsraten sind für beide Korrekturverfahren in Tabelle 3.9 (Methode I) und Tabelle 3.10 (Methode II) gegenübergestellt.

Tabelle 3.9: Mit Korrekturmethode I korrigierte Wiederfindungswerte von DA, OA und STX.

Eingesetzte Menge [µg/L]	Wiederfindung DA		Wiederfindung OA		Wiederfindung STX	
	[µg/L]	[%]	[µg/L]	[%]	[µg/L]	[%]
2	2,2	108,6	1,9	94,6	0,9	46,3
5	4,7	94,8	4,9	98,5	2,4	47,6
5	4,9	97,0	5,1	101,6	2,4	47,7
15	14,6	97,6	14,9	99,2	9,3	61,7
Mittelwert	99,5 ± 6,2		98,5 ± 2,9		50,8 ± 7,3	

Tabelle 3.10: Mit Korrekturmethode II korrigierte Wiederfindungswerte von DA, OA und STX.

Eingesetzte Menge [µg/L]	Wiederfindung DA		Wiederfindung OA		Wiederfindung STX	
	[µg/L]	[%]	[µg/L]	[%]	[µg/L]	[%]
2	3,6	181,4	2,3	115,7	3,3	162,6
5	6,6	130,9	5,5	110,7	6,8	135,6
5	6,4	127,5	5,6	111,0	7,9	157,2
15	19,1	127,1	16,6	110,3	20,8	138,9
Mittelwert	141,7 ± 26,5		111,9 ± 2,5		148,6 ± 13,3	

Die Konzentrationen 2, 5 und 15 µg/L wurden gewählt, da diese innerhalb der Arbeitsbereiche jedes Phycotoxins liegen. Einzig die mit 15 µg/L OA versetzte Probe

überschritt den oberen Arbeitsbereich. Dennoch konnten 14,9 µg/L OA gefunden werden, was einer Wiederfindungsrate von 99,2% mit der Korrekturmethode I entsprach. Die mit 2 und 5 µg/L OA versetzten Proben wurden zu 1,9 µg/L und 4,9 µg/L bzw. 5,1 µg/L mit Wiederfindungsraten von 94,6% und 98,5% bzw. 101,6% bestimmt. Diese Daten lassen denselben Schluss zu, dass eine Korrektur mit Methode I bei einem konstanten CL-Signalverlust in der Regeneration zu Wiederfindungsraten um 100% führt. Das Phycotoxin DA zeigte einen zu OA vergleichbaren linear abfallenden Regenerationsverlauf, so dass hier auch Wiederfindungsraten im Bereich von 100% erreicht wurden. Die berechneten Konzentrationen für DA waren 2,2 µg/L (108,6%), 4,7 µg/L (94,8%), 4,9 µg/L (97,0%) und 14,6 µg/L (97,6%). Für STX wurde eine gemittelte Wiederfindung von etwa 50% erreicht, wobei im Detail 0,9 µg/L (46,3%), 2,4 µg/L (47,6%) und 2,4 µg/L (47,7%) gefunden wurden. Die höher dotierte Konzentration (15 µg/L) wurde zu 9,3 µg/L gefunden, was einer Wiederfindungsrate von 61,7% entsprach. Die Anwendung der Korrekturmethode I führte demnach zu einer gemittelte Wiederfindungsrate im Bereich von 100% für DA und OA, während STX in einer Unterbestimmung von 51% resultierte.

Im Gegensatz dazu führte die Korrekturmethode II zu höheren Wiederfindungsraten. Bei Anwendung der Korrekturfaktoren von der zweiten Methode betrug die berechnete Wiederfindung 141,7% für DA und 111,9% für OA. Für die Erstellung der linearen Fitfunktion wurden jeweils drei Blankmessungen verwendet. Im Vergleich zu der oben beschriebenen Bestimmung der Wiederfindungsraten mit 6 Blankmessungen zeigte dieses Beispiel, dass mehr Blankmessungen benötigt werden, um eine zuverlässige Korrektur der Wiederfindungen zu erreichen. Beide Korrekturmethoden lieferten für STX eine ähnlich hohe Abweichung der Wiederfindungsraten von 100%.

Fazit

Eine Bestimmung der Wiederfindungsraten für Phycotoxine ohne vorherige Korrektur der CL-Signale resultierte in Überbestimmungen von mehr als 200%. Um die CL-Signale zu korrigieren, wurden zwei Korrekturmethoden eingeführt. Die Korrekturmethode I basiert dabei auf der Korrektur über das Verhältnis von Blankmessungen. Im Gegensatz dazu beruht Korrekturmethode II auf der Anwendung eines Korrekturfaktors auf alle Messpunkte. Der Korrekturfaktor wurde dazu über die linearen (für DA und OA) und exponentiellen (für STX) Fitfunktionen der Blankmessungen berechnet. Beide Methoden führten zu guten Wiederfindungsraten für die Phycotoxine DA und OA. Mit Methode I resultierte STX in einer Unterbestimmung, hingegen mit Methode II in einer Überbestimmung. Im Folgenden wird für

die Berechnungen der Wiederfindungsraten die Korrekturmethode I angewandt, da bei den Messungen in Matrix die Anzahl der Blankmessungen von 3 nicht überstiegen wurde und somit die Erstellung von Fitfunktionen nicht sinnvoll war.

3.1.11 Messung von Muschelproben

3.1.11.1 Probenvorbereitung

In Abbildung 3.25 sind die wichtigsten Schritte der Probenvorbereitung von Muschelproben graphisch dargestellt. Die Muscheln wurden zunächst unter fließendem Wasser gesäubert und aufgebrochen. Anschließend wurde das Muschelfleisch aus der Schale entfernt, das vorhandene Wasser abgetropft und das Muschelfleisch püriert. Die Schritte 1 – 4 der Probenvorbereitung wurden durch den Kooperationspartner Institute of Agri-Food and Land Use (IAFLU) durchgeführt.

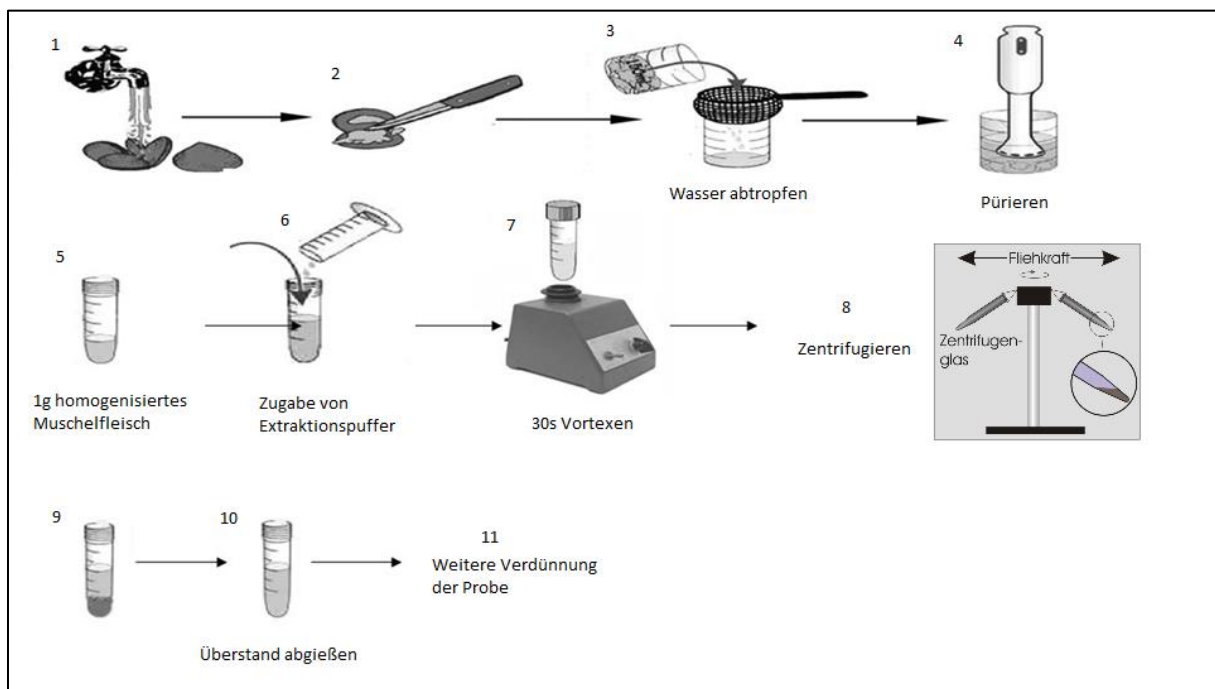


Abbildung 3.25: Vorbereitung von Muschelproben.

Um vorhandene Phycotoxine in einer Muschelprobe zu analysieren, wurde 1 g homogenisiertes Muschelfleisch in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 5 mL Extraktionspuffer versetzt. Anschließend wurde die Muschelprobe für 30 s auf dem Vortexer durchmischt und für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Zugabe von PBS weiter verdünnt. Die Auswahl eines geeigneten Puffers für eine parallele Extraktion der Phycotoxine

sowie die Bestimmung des Verdünnungsfaktors sind im folgenden Kapitel 3.1.11.2 beschrieben.

3.1.11.2 Auswahl des Extraktionspuffers & Bestimmung der Extraktionsfaktoren

Um mit der Durchfluss-Mikroarray-Plattform MCR3 eine parallele Identifizierung und Quantifizierung von Phycotoxinen in Muschelproben zu erzielen, wurde nach einem geeigneten Extraktionspuffer für die drei Muscheltoxine gesucht. In der Literatur sind für jedes Muscheltoxin mehrere verschiedene Extraktionspuffer bzw. -prozesse beschrieben [26, 162, 169, 177, 182, 183, 246, 247]. Zurzeit existiert jedoch keine Vorgabe für einen standardisierten Extraktionsvorgang aller Muscheltoxine.

Da es sich bei OA um ein lipophiles Toxin, hingegen bei DA und STX um hydrophile Toxine handelte, wurde der Einfluss von organischen und wässrigen Lösungen auf die Extraktion von DA, OA und STX untersucht. Hierfür wurde nicht kontaminiertes Muschelfleisch vor und nach der Extraktion mit Toxinen versetzt (Abbildung 3.26). Eine Dotierung mit Toxinen nach der Extraktion stellte eine simulierte Wiederfindung von 100% in der Extraktion dar. Durch den Vergleich der simulierten Extraktion mit 100% Wiederfindung und der tatsächlichen Extraktion wurde der Verlust von Muscheltoxinen bedingt durch die Extraktion bestimmt.

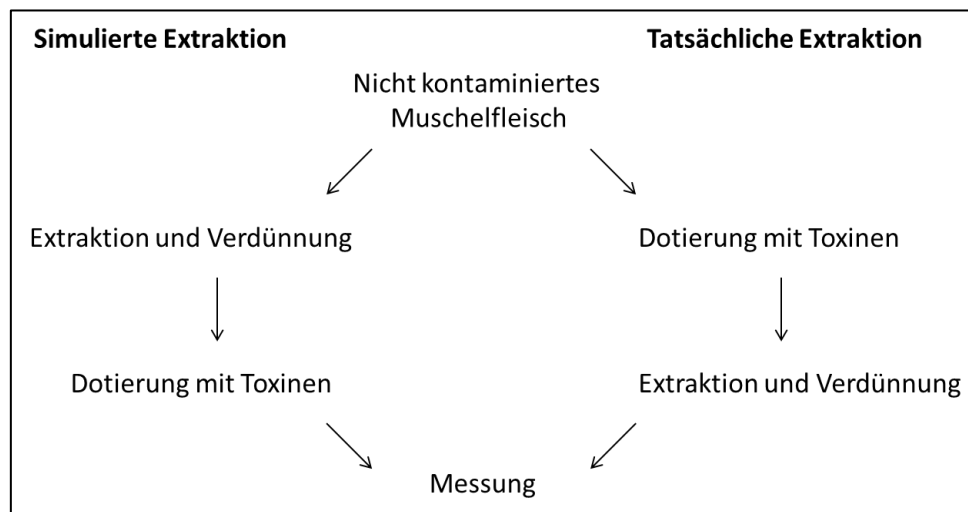


Abbildung 3.26: Bestimmung des Extraktionsverlustes durch Dotierung vor und nach der Extraktion.

Als Extraktionspuffer wurden Methanol, eine Mischung von Methanol und Wasser (1:1) und destilliertes Wasser verwendet. Vor der Messung am MCR3 ist bei beiden Extraktionswegen eine Verdünnung mit PBS notwendig, damit zum einen die gleichen Matrixbedingungen vorliegen und zum anderen die Konzentration der Toxine im sensitivsten Bereich der Kalibrierkurve um den Testmittelpunkt liegt. Die hierfür benötigten Verdünnungsfaktoren

wurden entsprechend eingestellt, dass die höchstzulässigen Grenzwerte für jedes Muscheltoxin, welche 20 mg/kg für DA, 160 µg/kg für OA und 800 µg/kg für STX betragen, im sensitivsten Bereich der Kalibrierkurve liegen. Grundlage für die Berechnung der Verdünnungsfaktoren sind die Konzentrationen 5 µg/L DA, 3 µg/L OA und 2,5 µg/L STX, die nahe am Testmittelpunkt der jeweiligen Kalibrierkurve liegen. Somit ergaben sich Verdünnungsfaktoren von 1/667 DA, 1/9 für OA und 1/50 für STX. Durch Anwendung der gleichen Verdünnungsfaktoren bei der simulierten Wiederfindung von 100% und der tatsächlichen Wiederfindung konnte sichergestellt werden, dass der Verlust von Phycotoxinen in der Extraktion nicht durch unterschiedliche Matrixeinflüsse hervorgerufen wird.

Welche Folgen die Verwendung der verschiedenen Extraktionspuffer auf die gefundenen Konzentrationen der Phycotoxine hat, wurde mittels der CL-Signalunterschiede auf dem MCR3 ermittelt. Hierzu wurden neun Mikroarray-Chips mit dem Spottingmuster aus Abbildung 3.5 angefertigt. Von den neun Mikroarrays wurden jeweils drei für ein Muscheltoxin verwendet, wovon jeweils ein Chip für die Messung eines Extraktionspuffers eingesetzt wurde. Alle Mikroarray-Chips wurden in der gleichen Weise analysiert, wobei auf jedem Chip vier Messungen durchgeführt wurden. Der Messablauf enthielt jeweils zwei Blankmessungen (erste und dritte Messung). In der zweiten Messung wurde die simulierte Extraktion und in der vierten die tatsächliche Extraktion (für jeweils ein Phycotoxin mit einem bestimmten Extraktionspuffer) gemessen. Somit ergaben sich pro Extraktionsweg jeweils 9 verschiedene Paare von Muscheltoxinen mit Extraktionspuffern. Da jedes Phycotoxin-Extraktionspuffer-Paar auf einem Mikroarray-Chip gemessen wurde, musste der Regenerationseffekt mithilfe der Gleichung 15 korrigiert werden. Für die Normierung der CL-Signale wurde die jeweils zuvor gemessene Blankmessung verwendet. Die normierten CL-Signale für jedes Phycotoxin- und Extraktionspuffer-Paar sind in Tabelle 3.11 gezeigt.

Tabelle 3.11: Normierte CL-Signale der verschiedenen Toxin-Extraktionspuffer-Paare.

Dotierung mit Phycotoxinen	Extraktionspuffer	Normierte CL-Signale [%]		
		DA	OA	STX
a) nach der Extraktion (simuliert)	MeOH	59,6	44,1	61,6
	MeOH/H ₂ O (1/1)	62,6	38,2	66,0
	H ₂ O	66,3	37,9	56,2
b) vor der Extraktion (tatsächlich)	MeOH	56,6	32,0	63,4
	MeOH/H ₂ O (1/1)	44,8	35,1	72,2
	H ₂ O	44,3	37,8	66,2

Erwartungsgemäß sollten die hydrophilen Toxine DA und STX eine hohe Anreicherung in Extraktionsmitteln aufweisen, je höher deren Anteil an Wasser ist. Für OA als lipophiles Toxin wurde erwartet, dass Methanol den höchsten Effekt bei der Akkumulation dieses Phycotoxins im Extraktionsprozess zeigt.

Für die Dotierung der Phycotoxine nach Extraktion und Verdünnung der Muschelproben wurden diese Erwartungen bestätigt. Folglich wurden für die simulierte Extraktion die höchsten CL-Signale für DA mit Wasser als Extraktionsmittel erreicht. Die höchsten CL-Signale für OA resultierten mit Methanol und für STX mit der Methanol-Wasser-Mischung. Jedoch resultierten im Gegensatz dazu bei einer Dotierung mit Phycotoxinen vor Extraktion und Verdünnung der Muschelproben die höchsten CL-Signale für DA mit Methanol als Extraktionsmittel und für OA mit Wasser. Für STX führte weiterhin die Methanol-Wasser-Mischung zu den höchsten CL-Signalen. Da die Variation des Extraktionspuffers für beide Extraktionswege einen gegenläufigen Trend für DA und OA zeigte, wird für die weiteren Messungen die Methanol-Wasser-Mischung (1/1) zur gemeinsamen Extraktion verwendet, welche einen Kompromiss für hydrophile und lipophile Phycotoxine darstellt.

3.1.11.3 Kalibrierung

Um den Einfluss von Matrixeffekten bzw. des verwendeten Extraktionspuffers auf die Wiederfindungsraten zu bestimmen, wurden Kalibrierungen in extrahiertem Muschelfleisch erstellt. Dazu wurde 1 g Muschelfleisch mit 5 mL eines Methanol-Wasser-Gemisches (1/1) versetzt, für 30 s mithilfe des Vortexers durchmischt und für 10 min zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand entsprechend des jeweiligen Verdünnungsfaktors mit PBS verdünnt und Kalibrierstandards im Bereich von 0 – 500 µg/L bzw. 1000 µg/L für jedes Phycotoxin erstellt. Für jedes Phycotoxin wurde so eine Einzel-Kalibrierung ($m = 5$, $n = 7$) aus extrahiertem Muschelfleisch gemessen. Über die Verdünnungsfaktoren konnten die Kalibrierdaten von der Einheit µg/L in µg/kg übertragen werden. Die Arbeitsbereiche der Kalibrierkurven schlossen die höchstzulässigen Grenzwerte von 20 mg/kg für DA, 160 µg/kg für OA und 800 µg/kg für STX ein, wobei diese in der Nähe des Testmittelpunktes dem sensitivsten Bereich der Kalibrierkurven lagen. Ein Vergleich der Tabelle 3.12 und den Tabelle 3.6 zeigte, dass die Kalibrierdaten für die Testmittelpunkte, Nachweisgrenzen und Arbeitsbereiche in ähnlichen Größenordnungen lagen. Folglich haben die Muschelmatrix sowie der Extraktionspuffer keinen Einfluss auf die Kalibrierungen, so dass die weiteren simultanen Kalibrierungen der Phycotoxine in PBS erfolgen können.

Tabelle 3.12: Daten der Einzelkalibrierungen der Toxine aus extrahiertem Muschelfleisch ($m = 5$, $n = 7$).

Toxin	IC ₅₀ [µg/L]	WR (20 – 80%) [µg/L]	LOD [µg/L]
DA	5,7 ± 0,3	0,5 ± 0,2 – 38,8 ± 1,6	0,5 ± 0,3
OA	3,0 ± 0,5	1,4 ± 0,7 – 7,1 ± 1,2	1,0 ± 0,6
STX	3,0 ± 0,2	0,6 ± 0,1 – 20,5 ± 2,3	0,4 ± 0,2

Toxin	Grenzwert [µg/kg]	IC ₅₀ [µg/kg]	WR (20 – 80%) [µg/kg]	LOD [µg/kg]
DA	20000	22732,7	2029,3 – 154980,1	1841,8
OA	160	160,5	75,3 – 382,2	51,9
STX	800	884,5	188,3 – 5785,1	131,3

3.1.11.4 Wiederfindung

Dotierte Muschelproben

Für die Bestimmung der Wiederfindungsraten wurde homogenisiertes Muschelfleisch mit Phycotoxinen versetzt und der oben beschriebene Extraktionsvorgang durchgeführt. Der Überstand wurde mit PBS-Puffer unter Verwendung des für jedes Phycotoxin erforderlichen Verdünnungsfaktors verdünnt. Dies resultierte in drei Proben mit einer theoretischen

Dotierung von 20,0 mg/kg (5 µg/L) DA, 160 µg/kg (3 µg/L) OA und 800 µg/kg (2,5 µg/L) STX. Die drei Proben wurden anhand der beschriebenen Messstrategie in Kapitel 3.1.8 analysiert. Jede dieser drei Proben wurde mit einem Gemisch aus allen Antikörpern gemessen. Dies ermöglichte, vorhandene Kontaminanten aller Phycotoxin-Familien qualitativ mit nur einer Messung bestimmen zu können. Um eine quantitative Analyse zu gewährleisten, wurden die Muschelproben gemäß ihres Verdünnungsfaktors verdünnt, um für eine Bestimmung der Konzentration im sensitiven Bereich der Kalibrierkurven zu liegen. So wurden für DA 16,4 mg/kg (4,1 µg/L) im Muschelfleisch mit einer Wiederfindungsrate von 82,3% erhalten. Für OA wurden 234,9 µg/kg (4,4 µg/L) wiedergefunden, was einer Wiederfindungsrate von 146,8% entsprach. Mit einer Wiederfindungsrate von 61,2% betrug die gefundene Konzentration für STX 489,6 µg/kg (1,5 µg/L) in Muschelfleisch. Tabelle 3.13 zeigt die eingesetzte Menge an Phycotoxinen gegenüber der gefundenen Menge.

Tabelle 3.13: Wiederfindungsraten von dotierten Muschelproben.

Toxin	Eingesetzte Menge		Gefundene Menge		
	[µg/L]	[µg/kg]	[µg/L]	[µg/kg]	[%]
Domoinsäure	5,0	20,0*10 ³	4,1	16,4*10 ³	82,3
Okadasäure	3,0	160,0	4,4	234,9	146,8
Saxitoxin	2,5	800,0	1,5	489,6	61,2

Realproben

Kontaminierte Muschelproben wurden vom Kooperationspartner Institute of Agri-Food and Land Use (IAFLU) zur Verfügung gestellt. Jede dieser drei Muschelproben enthielt eine Phycotoxinklasse mit seinen verschiedenen Derivaten, wobei die Konzentration der einzelnen Analoga zuvor chromatographisch mit HPLC-MS analysiert wurde (siehe Tabelle 3.15). Für die mit PSP kontaminierte Muschelprobe wurden 394,8 µg/kg C1/C2, 1132,4 µg/kg GTX2/3, 134,0 µg/kg STX, 1870,7 µg/kg GTX1/4 und 95,52 µg/kg NEO angegeben. In der mit DSP kontaminierten Probe waren 139,0 µg/kg OA, 32,0 µg/kg DTX1 und 133 µg/kg DTX2 enthalten. Für die ASP Toxine stand keine kontaminierte Muschelprobe zur Verfügung, so dass eine homogenisierte Jakobsmuschelprobe verwendet wurde, welche zu 40,93 µg/kg DA in Muschelfleisch bestimmt wurde.

Die Identifizierung und Quantifizierung der Muschelproben am MCR3 erfolgte an zwei Tagen, wobei jeden Tag eine Kalibrierung der Toxine in PBS durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Wiederfindungen in aufeinander folgenden Messungen mit eingeschobenen Blank-Messungen bestimmt. Die durch das IAFLU deklarierten positiven Muschelproben wurden auch am MCR3 als positiv auf die jeweilige Phycotoxinklasse getestet. Es wurden gemittelte Wiederfindungen von $231,8 \pm 127,1$ mg/kg für DA, $136,8 \pm 93,2$ µg/kg für OA und $755,2 \pm 199,1$ µg/kg STX erhalten.

Das Ergebnis der Mikroarray-Messungen gibt jedoch nur eine Schätzung des gesamten Phycotoxingehalts in den Muschelproben wieder, da die Muschelproben neben DA, OA und STX auch Analoga dieser Toxin-Familien enthielten. Das Vorhandensein von verschiedenen Analoga bzw. deren Kreuzreaktivität mit den verwendeten Antikörpern stellt eine Limitierung für Antikörper-basierte Nachweisverfahren dar. Je nach Affinität und Selektivität der verwendeten Antikörper führen einige vorhandene Analoga zu einer Überbestimmung, hingegen andere zu einer Unterbestimmung des Toxingehaltes in Muschelproben.

In Tabelle 3.14 sind die Wiederfindungsraten der drei Muschelproben, die mit dem MCR3 und mittels HPLC-MS bestimmt wurden, gegenübergestellt.

Tabelle 3.14: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Bestimmung von Realproben mit dem MCR3 und mit HPLC-MS.

Phycotoxinklasse	Wiederfindung MCR3	Wiederfindung HPLC-MS
ASP-Toxine	$231,8 \pm 127,1$ mg/kg DA	40,9 mg/kg DA
DSP-Toxine	$136,8 \pm 93,2$ µg/kg OA	139,0 µg/kg OA, 32,0 µg/kg DTX1, 133,0 µg/kg DTX2
PSP-Toxine	$755,2 \pm 199,1$ µg/kg STX	134,0 µg/kg STX, 394,8 µg/kg C1/C2, 95,5 µg/kg NEO, 1132,4 µg/kg GTX2/3, 1870,7 µg/kg GTX1/4

Zusammenfassung und Fazit

Die Realisierung des Ziels, ein Multiplex-Verfahren zur Detektion von Phycotoxinen in Muschelproben zu entwickeln, konnte hier gezeigt werden. Für die Analyse von Muschelproben war zunächst eine Extraktion notwendig, wofür eine Mischung aus Methanol und Wasser (1/1) als Extraktionspuffer verwendet wurde. Mit PBS-Puffer wurden die Proben anschließend anhand des für jedes Phycotoxin bestimmten Verdünnungsfaktors (1/667 für

DA, 1/9 für OA und 1/50 für STX) weiter verdünnt. Die Phycotoxinkonzentration in den Muschelproben wurde mittels eines regenerierbaren Chemilumineszenz (CL)-Mikroarrays in einer definierten Messstrategie bestimmt. Die Regenerierbarkeit ermöglichte dabei eine interne Kalibrierung sowie die anschließende Bestimmung von Proben mit nur einem Mikroarray-Chip. In allen dotierten Muschelproben sowie in den Realproben konnten die drei Phycotoxine ermittelt werden. Zudem kann mit den berechneten Nachweisgrenzen von 1850 µg/kg für DA, 50 µg/kg für OA und 130 µg/kg für STX in Muschelfleisch sichergestellt werden, dass der Phycotoxin-Mikroarray für ein Screening zur Einhaltung der Grenzwerte von Phycotoxinen in Muschelfleisch verwendet werden kann. Eine Limitierung von Antikörper-basierten Verfahren stellt lediglich die Aufschlüsselung der Zusammensetzung der Toxinanaloga dar. Jedoch könnte im Anschluss an eine schnelle sowie positive Identifizierung der Phycotoxinklassen in Muschelproben, eine exakte Bestimmung der Analoga mittels chromatographischer Methoden erfolgen.

3.2 Proteotoxine

Eine weitere wesentliche Zielsetzung dieser Arbeit war die Entwicklung eines Antikörper-basierten Multiplex-Detektionssystem für biologische Kampfstoffe der höchsten Priorität im Chemiewaffen-Übereinkommen (CWÜ). Bei den verwendeten Analyten handelte es sich zum einen um hochmolekulare Proteotoxine wie das Pflanzentoxin Rizin mit einer molaren Masse von 60 kDa sowie das Bakterientoxin Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) mit einer molaren Masse von 30 kDa, zum anderen um das von marinen Mikroalgen (Dinoflagellaten) produzierte Saxitoxin (STX) mit einer molaren Masse von 0,3 kDa. Für den sensitiven und parallelen Nachweis dieser unterschiedlich großen Analyte wurden Durchfluss-Chemilumineszenz-(CL)-Mikroarrays entwickelt, die auf der Analysen-Plattform MCR3 ausgewertet werden können. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine parallele Ausführung zweier Assay-Prinzipien möglich ist. Zunächst wurde jedoch die Detektion der Biotoxine in Einzelnachweisen etabliert.

3.2.1 Assay-Prinzip

Die Identifizierung und Quantifizierung der hochmolekularen Biotoxine Rizin und SEB basiert auf einem heterogenen Sandwich-ELISA (Assay-Prinzip siehe Kapitel 2.4.2). Hierfür wurden selektive Fängerantikörper kovalent auf einer Polyethylenglykol-modifizierten Glasoberfläche immobilisiert, welche die Biotoxine aus unterschiedlich komplexen Matrices binden. Alle Assay-Schritte des Sandwich-ELISAs wurden auf dem Mikroarray-Auslesesystem MCR3 voll automatisch im Durchfluss durchgeführt. Bei den einzelnen Assay-Schritten handelte es sich um die Zugabe von Biotoxinen, den Antigen-spezifischen Biotin-markierten Detektionsantikörpern sowie des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats. Der Nachweis der Biotoxine erfolgte anschließend über eine enzymkatalysierte Chemilumineszenz-Reaktion.

Für die hochmolekularen Biotoxine wurde ein Messprogramm mithilfe von Agglutinin und Rizin entwickelt. Agglutinin ist ein Rizin-Surrogat und besteht aus denselben Strukturen wie Rizin (siehe Kapitel 2.1.2.1). Die verwendeten Antikörper weisen somit eine Kreuzreaktivität [78, 248] zu Agglutinin auf und sind auch zum Nachweis von Agglutinin geeignet sind. Für die anfänglichen Messungen wurde zunächst Agglutinin verwendet, weil es eine geringere Toxizität verglichen mit Rizin zeigt.

3.2.2 Problemstellung

Für die Etablierung eines Durchfluss-Multidetektions-Systems für Biotoxine galt es die Parameter zu ermitteln bzw. zu optimieren, die den größten Einfluss auf die CL-Signalintensität haben. Hierbei bot die Optimierung des Messprogramms den größten Spielraum mit der Einstellung von Flussraten, Volumeneinheiten und Interaktionszeiten. Zunächst musste bestimmt werden, welche der Schritte, beginnend mit der Bindung der Fängerantikörper und der Analyte, der Detektionsantikörper zu den Analyten bis hin zur Bindung von Streptavidin und Biotin, für die Erzeugung hoher CL-Signale von Bedeutung sind. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Immobilisierung der Fängerantikörper auf dem Mikroarray-Chip. Hierfür wurde auf die, am Institut entwickelte, kovalente Oberflächenanbindung über die NHS-Aktivierung für Antikörper zurückgegriffen [230]. Auch die Auswahl geeigneter Fänger- und Detektionsantikörper sowie die Bestimmung optimaler Konzentrationen musste für jeden Analyten untersucht werden.

Für die Detektion von Rizin wurden die vom Kooperationspartner Robert Koch-Institut hergestellten Antikörper verwendet [95]. Es standen folgende Antikörper zur Verfügung: die monoklonalen Fängerantikörper mAk R109/3 und mAk R21/5/5, der polyklonale Fängerantikörper pAk RH21 und die monoklonalen Detektionsantikörper mAk R18/1 bzw. mAk R18/1/1 sowie der schon vom RKI Biotin-markierte mAk R18/1-bio (Verdünnung 1:640), der zur Unterscheidung mit R18/1-bio-RKI abgekürzt wird. Um die anderen Detektionsantikörper für die Messungen verwenden zu können, wurden diese zuvor mit Biotin markiert. Anschließend wurde die Konzentration am Nanophotometer ermittelt und für die Messungen auf eine Konzentrationen von 6,9 mg/L für R18/1-bio (Verdünnung 1:1000) und 1,6 mg/L für R18/1/1-bio (Verdünnung 1:1000) eingestellt.

Für die ersten Messungen von Agglutinin wurden die monoklonalen Fängerantikörper R109/3 und R21/5/5 mit jeweils einer Konzentration von 100, 500 und 1000 mg/L auf den Mikroarray-Chips immobilisiert. Die Zugaben von Agglutinin in den Konzentrationen 1 mg/L und 8 mg/L, den Biotin-markierten spezifischen Detektionsantikörpern (mAk R18/1-bio-RKI) und dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (SA-HRP) erfolgten nacheinander, wobei der Mikroarray nach jedem Schritt mit PBST gespült wurde. Die Lösungen wurden mit Flussraten von jeweils 5 $\mu\text{L/s}$ über den Mikroarray-Chip geleitet. Die Flussrate von SA-HRP betrug 10 $\mu\text{L/s}$.

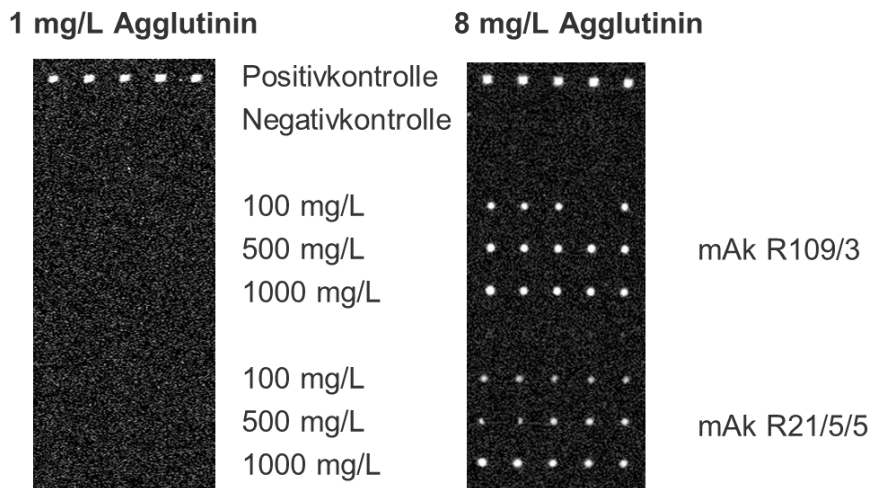


Abbildung 3.27: Erste Messungen von Agglutinin (links: 1 mg/L, rechts: 8 mg/L) am MCR3.

Eine Konzentration von 1 mg/L Agglutinin zeigte keine CL-Signale. Folglich wurden die Konzentration von Agglutinin und zugleich die Konzentration des Detektionsantikörpers schrittweise erhöht. Erst eine Konzentration von 8 mg/L Agglutinin führte zu sehr schwachen CL-Signalen (< 1000 a.u.), wobei zusätzlich der Antikörper R18/1-bio-RKI in einer 2-fach höheren Konzentration (Verdünnung 1:320) eingesetzt wurde. Mit dem mAk R109/3 konnten geringfügig höhere CL-Signale erzielt werden, welche um die Faktoren 0,8, 1,6 und 3,5 für die Konzentrationen 100, 500 und 1000 mg/L höher waren. Die Messung der hohen Konzentration von 8 mg/L Agglutinin bestätigte, dass die Fängerantikörper kovalent auf dem Mikroarray-Chip immobilisiert wurden und alle Antikörper den Analyten binden. Weitere Optimierungsarbeit mit einer Konzentration von 8 mg/L Agglutinin hinsichtlich der Verschiebung des Messbereichs zu kleineren Konzentrationen im Durchfluss-Systems war jedoch nicht möglich, da die Biotoxine nicht in ausreichend hohen Mengen zur Verfügung standen.

3.2.3 Realisierung einer Signalamplifikation im stationären System

3.2.3.1 Erhöhung der Sensitivität des Assays durch das Konjugat SA-PolyHRP40

Das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert die Reaktion zwischen Luminol und Wasserstoffperoxid, wobei Chemilumineszenz gebildet wird. Für die Generierung des CL-Signals standen zwei Konjugate zur Verfügung. Die Streptavidin-Meerrettichperoxidase (SA-HRP), welche einen molaren Anteil von 1,5 HRP-Enzymen zu Streptavidin besitzt und die Streptavidin-PolyMeerrettichperoxidase (SA-PolyHRP40). SA-PolyHRP40 besteht aus

einem supramolekularen Komplex aus fünf Untereinheiten, welche sich zu je 40 HRP-Enzymen zusammensetzen (siehe Abbildung 2.16). Somit besitzt ein PolyHRP-Konjugat insgesamt 200 aktive Enzymmoleküle. Am Rand dieses Komplexes befinden sich die Streptavidin-Einheiten, mit denen SA-PolyHRP40 an Biotin-markierte Antikörper binden kann.

Für einen Vergleich beider Peroxidase-Konjugate SA-HRP und SA-PolyHRP40 wurden zwei Kalibrierkurven aufgenommen. Dazu wurde der monoklonale Antikörper R109/3 in zwei Mikrotiterplatten immobilisiert. Anschließend wurde Agglutinin in den Konzentrationen 0 – 1000 $\mu\text{g/L}$, die Detektionsantikörper R18/1-bio und R18/1-bio-RKI und die verschiedenen HRP-Konjugate jeweils nacheinander in die zwei Mikrotiterplatten pipettiert, wobei Agglutinin für 2 h und die weiteren Assay-Schritte für 1 h inkubiert wurden. Beide HRP-Konjugate wurden in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt, was einer Konzentration von 0.2 $\mu\text{g/L}$ entsprach. Die resultierenden Kalibrierkurven sind in Abbildung 3.28 dargestellt.

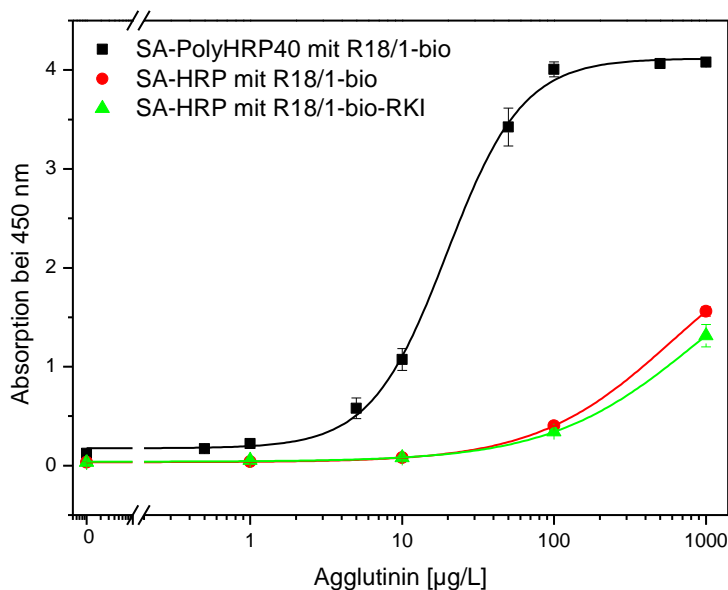


Abbildung 3.28: Vergleich der Kalibrierkurven von Agglutinin bei Verwendung von SA-PolyHRP40 mit R18/1-bio (schwarze Kurve, $m = 6$, $n = 9$), SA-HRP mit R18/1-bio (rote Kurve, $m = 6$, $n = 5$) und SA-HRP mit R18/1-bio-RKI (grüne Kurve, $m = 6$, $n = 5$).

Durch die Verwendung des Konjugates SA-HRP wurden die rote und die grüne Kalibrierkurve gemessen. Dabei wurden mit den verwendeten Antikörpern R18/1-bio (1:1000) und R18/1-bio-RKI (1:640) annähernd gleiche Kalibrierkurven erhalten. Diese Kalibrierkurven erreichen keine Sättigung des CL-Signals und besitzen somit auch keine obere Asymptote. Die gemessene Konzentration 100 $\mu\text{g/L}$ kann bei beiden Kalibrierkurven mit einem Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) von ca. 11 vom Hintergrund unterschieden

werden. Im Gegensatz dazu weist die schwarze Kalibrierkurve einen sigmoidalen Verlauf mit einer oberen Asymptote auf, der weit über der roten und grünen Kurve liegt. Im Vergleich zu SA-HRP führte die Verwendung des Konjugates SA-PolyHRP40 bei einer Konzentration von 1 mg/L zu einer Signalsteigerung um den Faktor 3. Auch eine Konzentration von 100 µg/L Agglutinin lag noch in der oberen Asymptote. Hier wurde eine Signalsteigerung um den Faktor 12 erreicht. Zudem waren die Konzentrationen 5 und 10 µg/L mit einem SNR von 5 und 9 auch detektierbar. Mittels SA-PolyHRP40 wurden folgende Kalibrierdaten für Agglutinin erhalten. Der Testmittelpunkt (IC_{50}) wurde zu 19,7 µg/L bestimmt und die berechnete Nachweisgrenze lag bei 0,1 µg/L. Der festgelegte Arbeitsbereich von 20 – 80% entsprach 8,0 – 48,5 µg/L.

Die erhöhte Anzahl an HRP-Enzymen im SA-PolyHRP40-Konjugat resultierte in einem größeren Umsatz von Wasserstoffperoxid und Luminol, was schlussendlich zu einer höheren Chemilumineszenz führte. Somit konnte durch die Verwendung von SA-PolyHRP40 die Sensitivität des Assays gesteigert werden. Im Folgenden wird deswegen nur noch SA-PolyHRP40 für die Detektion der Biotoxine eingesetzt.

3.2.3.2 Verkürzung der Assayzeiten

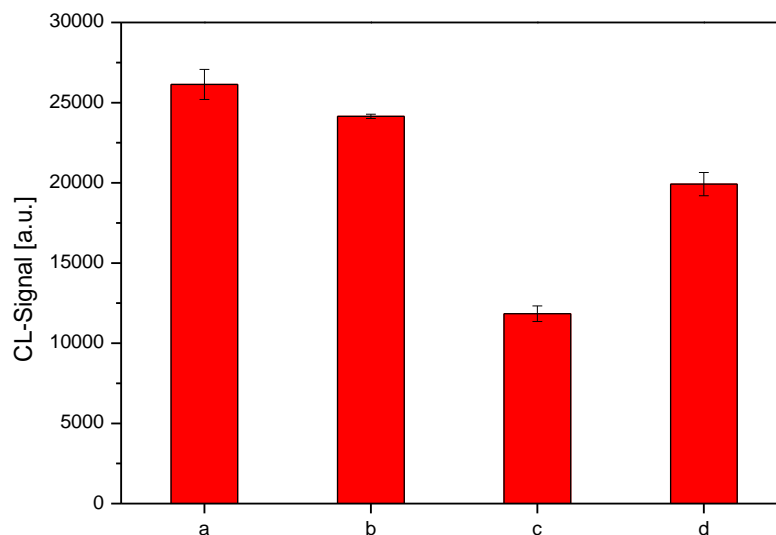
Die Messergebnisse des im vorherigen Kapitel beschriebenen ELISA-Experiments in Mikrotiterplatten wurden nach ca. 3,5 h erhalten. Folglich zielte das folgende Experiment darauf ab, die zeitintensiven Schritte des Assays zu ermitteln, die hinsichtlich der Bindung des Analyten und somit der Erhöhung der CL-Signalintensitäten von Bedeutung sind. Zudem sollte geklärt werden, ob die Assayzeit ohne einen Verlust von CL-Signalintensitäten verkürzt werden kann.

Dafür wurden die einzelnen Schritte eines Assays wie die Zugabe von Agglutinin (1 mg/L), die Zugabe der Detektionsantikörper R18/1-bio-RKI (1:640) und des Konjugats SA-PolyHRP40 (1:5000) nacheinander in die Flusszellen des Mikroarray-Chips pipettiert und unterschiedlich lange inkubiert. Der Einfluss auf die CL-Signale wurde dabei bei einer Inkubationszeit von 1 h und von 15 min miteinander verglichen, wodurch 4 Varianten (a - d) resultierten. Tabelle 3.15 gibt die vier verschiedenen Varianten mit den jeweiligen Inkubationszeiten und die zugehörigen erreichten CL-Signalintensitäten wieder.

Tabelle 3.15: Untersuchung verschiedener Inkubationszeiten im Mikroarray-Chip.

Assay-Schritt	a	b	c	d
1) Agglutinin	1 h	1 h	1 h	15 min
2) Detektionsantikörper (R18/1-bio)	1 h	1 h	15 min	1 h
3) SA-PolyHRP40	1 h	15 min	15 min	15 min
CL-Signal [a.u.]	26100 ± 900	24100 ± 100	11800 ± 500	19900 ± 700

Die erreichten CL-Signalintensitäten für die vier Varianten sind graphisch in Abbildung 3.29 dargestellt. Für die Varianten a und b konnten annähernd gleich hohe CL-Signalintensitäten gemessen werden. Die Verkürzung der Inkubationszeit für das PolyHRP-Konjugat von 1 h auf 15 min ergab lediglich einen Signalabfall von 7,6%. Aus diesem Resultat wurde gefolgert, dass die Bindung zwischen dem am Detektionsantikörper gebundenen Biotin und dem Streptavidin im PolyHRP-Konjugat sehr schnell verläuft und dieser Assay-Schritt bei Messungen auf der Durchfluss-Analyse-Plattform auch schnell durchgeführt werden kann.

**Abbildung 3.29:** Vergleich der erreichten CL-Signale durch unterschiedlich lange Inkubationszeiten (m = 6, n = 4).

Eine weitere Verkürzung der Inkubationszeit auf 15 min führte für den biotinylierten Antikörper (Variante c) bzw. Agglutinin (Variante d) zu einem deutlicheren Signalverlust von 51.0% bzw. 17,5% verglichen mit der Variante b. Der direkte Vergleich der Varianten c und d verdeutlicht, dass der zeitintensivste Assay-Schritt im Sandwich-ELISA die Bindung des Detektionsantikörper an den Analyten ist und dieser Schritt die längste Zeit im Durchflusssystem benötigen wird. Folglich müssen bei der Zugabe von Agglutinin und der Detektionsantikörper niedrige Flussraten gewählt werden.

3.2.3.3 Unterschied zwischen Agglutinin und Rizin bezüglich der Assay-Sensitivität

Die Resultate aus den vorangegangenen Kapiteln wurden genutzt, um mittels Kalibrierung von Agglutinin den Einfluss auf die Assay-Sensitivitäten zu untersuchen. Zudem wurde untersucht, inwiefern sich die Sensitivität des Assays steigern lässt, wenn Rizin anstatt Agglutinin verwendet.

Für diesen Versuch wurden Mikroarray-Chips mit Konzentrationen von 0, 0,1, 1, 10, 100 und 1000 $\mu\text{g/L}$ Agglutinin bzw. Rizin inkubiert. Für die Inkubation wurde die Variante d verwendet, die bei einer kurzen Assayzeit ausreichend hohe CL-Signale lieferte. Als Fängerantikörper wurde R109/3 und als Detektionsantikörper R18/1-bio eingesetzt. Die resultierenden Kalibrierkurven von Agglutinin und Rizin sind in Abbildung 3.30 dargestellt.

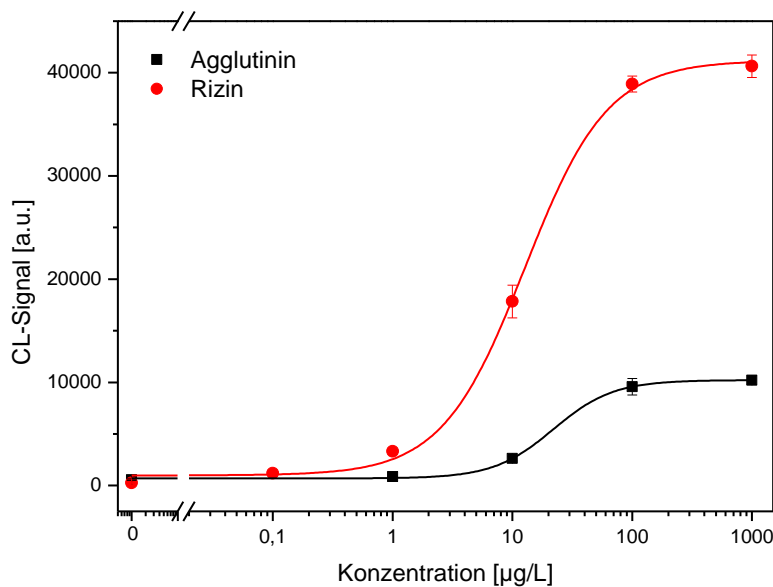


Abbildung 3.30: Kalibrierkurven von Agglutinin und Rizin ($m = 6$, $n = 6$).

Für beide Analyte wurden Kalibrierkurven erhalten, deren Arbeitsbereiche in einer ähnlichen Größenordnung liegen (siehe Tabelle 3.16). Im Vergleich zu Agglutinin wurden jedoch durch die Verwendung von Rizin große Signalsteigerungen um den Faktor 4 bei 1000 µg/L und 100 µg/L und um den Faktor 7 bei 10 µg/L erreicht. Zudem wies Rizin eine deutlich niedrigere Nachweisgrenze von 0,1 µg/L auf. Insgesamt ließ sich durch die Verwendung von Rizin die Sensitivität des Assays um einen Faktor von etwa 1,5 verbessern. Zudem ist im Vergleich zu Agglutinin die Nachweisgrenze für Rizin um eine Zehnerpotenz geringer.

Tabelle 3.16: Kalibrierdaten von Agglutinin und Rizin.

Toxin	IC ₅₀ [µg/L]	WR (20 – 80%) [µg/L]	LOD [µg/L]
Agglutinin	22,0	8,3 – 57,90	1,3
Rizin	12,7	3,9 – 41,2	0,1

Aus den Testmittelpunkten wurde die Kreuzreaktivität bestimmt, indem der Quotient aus dem IC₅₀-Wert des Analyten zu dem des Standards gemäß Gleichung 1 (Kapitel 3.1.4.1) berechnet wurde. Als IC₅₀-Wert des Analyten wurde der Testmittelpunkt von Agglutinin eingesetzt. Da keine Standardsubstanz vorhanden war, wurde der Testmittelpunkt von Rizin als Standard-Testmittelpunkt verwendet. Demnach resultierte eine Kreuzreaktivität von 100% für Rizin. Die Kreuzreaktivität von Agglutinin wurde auf 57,7% zu den Antikörpern R109/3 und R18/1-bio berechnet. Aufgrund der höheren Affinität der Antikörper zu Rizin, wurden keine weiteren Versuche mit dem Surrogat Agglutinin in stationären Systemen durchgeführt.

3.2.3.4 Auswahl geeigneter Antikörper-Paare

Wie bereits erwähnt, standen für die Detektion von Rizin mehrere Antikörper, die monoklonalen Fängerantikörper mAk R109/3 und mAk R21/5/5, der polyklonale Fängerantikörper pAk RH21 und die monoklonalen Detektionsantikörper mAk R18/1-bio bzw. mAk R18/1/1-bio, zur Verfügung. Hieraus ergaben sich 6 Möglichkeiten der Anordnung der Antikörper für die Bildung eines Sandwich-Formates (siehe Abbildung 3.31) zur Detektion von Rizin, welches für diesen Versuch in einer Konzentration von 1 mg/L eingesetzt wurde. Zur CL-Signalerzeugung wurde entweder das SA-PolyHRP40-Konjugat oder ein HRP-markierter Sekundärantikörper verwendet.

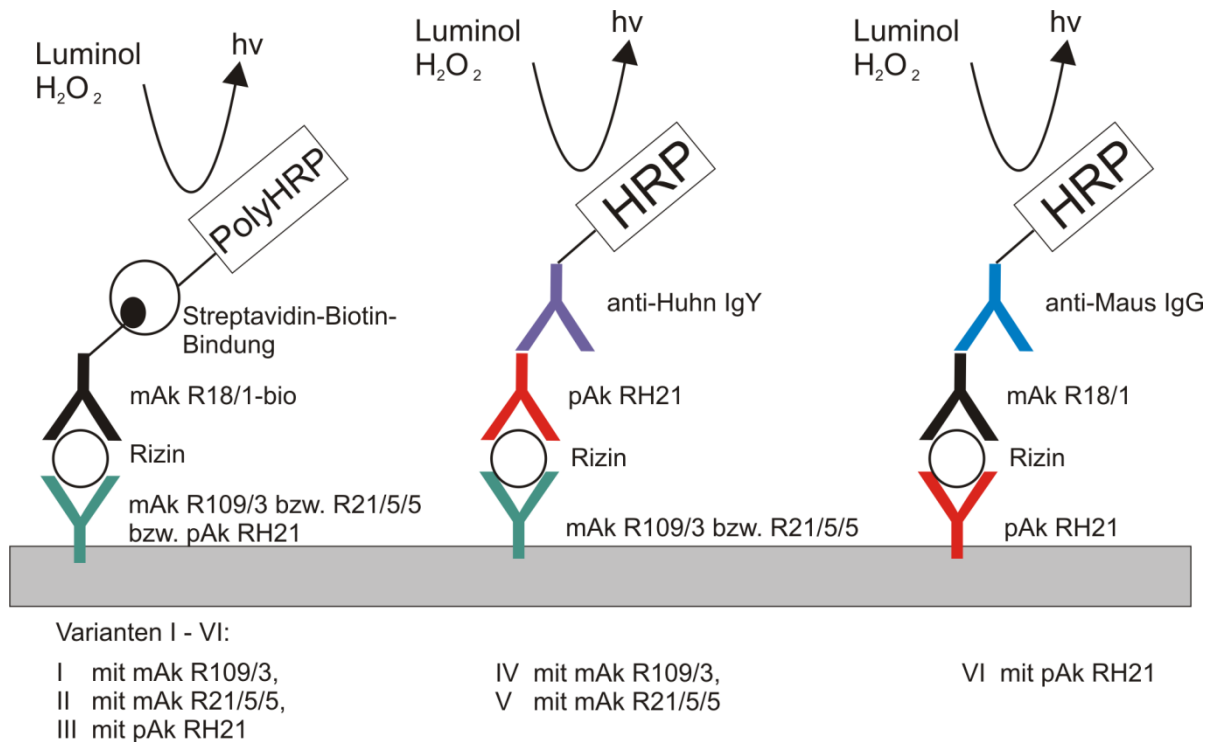


Abbildung 3.31: Mögliche sechs Anordnungen (I - VI) der Antikörper im Sandwich-Format zur Detektion von Rizin.

Alle Fängerantikörper (R109/3, R21/5/5 und RH21) können mit dem Detektionsantikörper R18/1-bio kombiniert werden, was hier die Möglichkeiten I bis III darstellt. Für die monoklonalen Fängerantikörper (R109/3 und R21/5/5) war eine Detektion auch über den polyklonalen Antikörper RH21 als Detektionsantikörper und einen weiteren HRP-markierten Antikörper (anti-Huhn) möglich. Zudem bestand die Möglichkeit Rizin mit dem polyklonalen Antikörper RH21 als Fängerantikörper und mit dem nicht biotinylierten R18/1 als Detektionsantikörper über einen weiteren HRP-markierten Antikörper (anti-Maus) nachzuweisen.

Alle 6 Kombinationen wurden in Mikroarray-Chips inkubiert, wobei hier die Variante a für das Assay-Programm (siehe Kapitel 3.2.3.2) verwendet wurde. Um auch schwache CL-Signale erfassen zu können, wurde jeder Assay-Schritt für 1 h inkubiert.

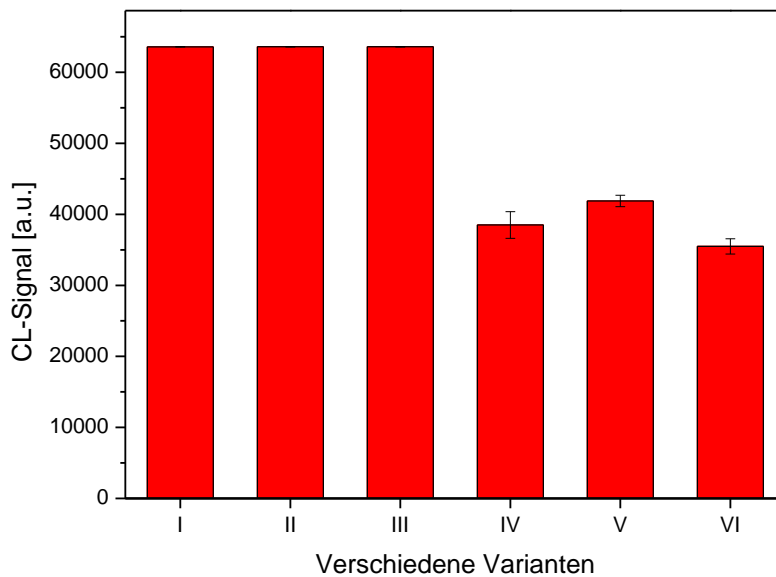


Abbildung 3.32: CL-Signalintensitäten der 6 Kombinationen aus Abbildung 3.31 ($m = 6$, $n = 6$).

Alle 6 verschiedenen Kombinationen zeigten hohe CL-Signalintensitäten. Jedoch führte eine lange Inkubation bei der Verwendung von SA-PolyHRP40 zu CL-Signalen, die in der Sättigung der CCD-Kamera lagen, weswegen auch für die Kombinationen I – III keine Standardabweichungen angegeben werden können. Anhand dieses Ergebnisses konnte kein bestimmter am besten geeigneter Fängerantikörper für Rizin ermittelt werden. Da Mikroarrays die Möglichkeit bieten mehrere Fängerantikörper nebeneinander zu immobilisieren und parallel zu messen, werden die drei Fängerantikörper R109/3, R21/5/5 und RH21 im direkten Vergleich im Durchfluss-System untersucht.

Für die Varianten IV – VI wurden geringere, aber dennoch hohe CL-Signale um 40000 a.u. erhalten. Aufgrund dieser geringeren Signalstärken, die durch die Verwendung der mit HRP-markierten, sekundären Antikörper im Vergleich zu dem PolyHRP-Konjugat erhalten wurden, werden im Folgenden nur noch die Kombinationen mit dem PolyHRP-Konjugat untersucht.

3.2.4 Übertragung der Ergebnisse auf ein Durchfluss-System

Die erhaltenen Schlussfolgerungen aus den Experimenten in den Mikrotiterplatten bezüglich der Erhöhung der CL-Signalintensitäten sowie der Assay-Sensitivität und der möglichen Verkürzung der Assayzeiten wurden auf die Durchfluss-Mikroarray-Plattform übertragen. Für die Generierung des CL-Signals wurde SA-PolyHRP40 verwendet, welches mit einer Flussrate von $10 \mu\text{L/s}$ über den Chip gegeben wurde. Die eingesetzte Konzentration von

Agglutinin betrug 1 mg/L. Als Detektionsantikörper kam R18/1-bio in einer Verdünnung von 1:1000 zum Einsatz.

3.2.4.1 Vergleich kontinuierliche Zugabe und Stopped-Flow-Zugabe

Im Gegensatz zu stationären Systemen, wo die Bindung des Antikörpers und Analyten über eine Gleichgewichtseinstellung erfolgt, ist diese Bindung in einem mikrofluidischen System durch horizontale Diffusion limitiert. Die Beeinflussung der Diffusion bzw. der Grenzschichtminimierung und somit die Auswirkungen auf die Bindung der einzelnen Komponenten wurde anhand von verschiedenen Flussraten untersucht. Zum einen wurden kontinuierliche Flussraten gewählt. Zum anderen wurden die Flussraten nach einem Stopped-Flow-Prinzip eingestellt, wobei bestimmte Volumeneinheiten in den Chip gepumpt werden und dort für eine bestimmte Zeit verblieben. Dadurch sollte eine Annäherung an ein stationäres System bewirkt werden. Die verwendeten Flussraten der aufeinanderfolgenden Zugaben von Agglutinin und des Detektionsantikörpers sind in Tabelle 3.17 zusammengefasst, wobei sich zwei Messprogramme a und b ergaben.

Tabelle 3.17: Flussraten für die Zugabe von Agglutinin und R18/1-bio-RKI.

Messprogramme	Zugabe Agglutinin	Zugabe R18/1-bio-RKI
a	5 μ L, 1 μ L/s, 10s	1 μ L/s
b	1 μ L/s	5 μ L, 1 μ L/s, 10s

Zunächst wurde Agglutinin in einer Konzentration von 1 mg/L nach einem Stopped-Flow-Prinzip zugegeben. Das bedeutete, dass jeweils 5 μ L der Agglutinin-Lösung mit einer Flussrate von 1 μ L/s in den Mikroarray-Chip gepumpt wurden und dort für 10 s verblieben, bis die nächste Volumeneinheit von 5 μ L nachgedrückt wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörpers R18/1-bio-RKI mit einer kontinuierlichen Flussrate von 1 μ L/s (Messprogramm a). Für das zweite Messprogramm b wurde Agglutinin in einem kontinuierlichen Fluss und der Detektionsantikörper im Stopped-Flow-Prinzip über den Chip gepumpt. Die Assaydauer betrug für beide Messprogramme 1 h 15 min.

Durch die Verwendung des PolyHRP-Konjugates und die verringerten Flussraten wurde eine Detektion von Agglutinin in sehr geringen CL-Signalintensitäten von ca. 800 – 3200 a.u. erreicht. Im Vergleich zu den stationären Systemen sind die CL-Signalintensitäten im

Durchfluss-System deutlich geringer. Gründe hierfür sind, dass die Flussraten der Antikörper, Interaktionszeiten bzw. -volumina zwischen Antikörpern und Analyt noch nicht optimiert sind und zudem zunächst Agglutinin als Analyt verwendet wurde. Jedoch konnte auch im mikrofluidischen System die Tendenz bestätigt werden, dass eine Verringerung der Flussrate des Detektionsantikörpers sich deutlich stärker auf die Intensität des CL-Signals auswirkt. Im Vergleich zu Messprogramm a wurden die CL-Signale für Messprogramm b um den Faktor 2 gesteigert. Zudem konnte beobachtet werden, dass für den Fängerantikörper R109/3 grundsätzlich höhere CL-Signale erzielt wurden. Der Hintergrund verhielt sich bei beiden Messprogrammen annähernd konstant, so dass unspezifische Bindungen an die Chipoberfläche bedingt durch die Flussrate ausgeschlossen werden können.

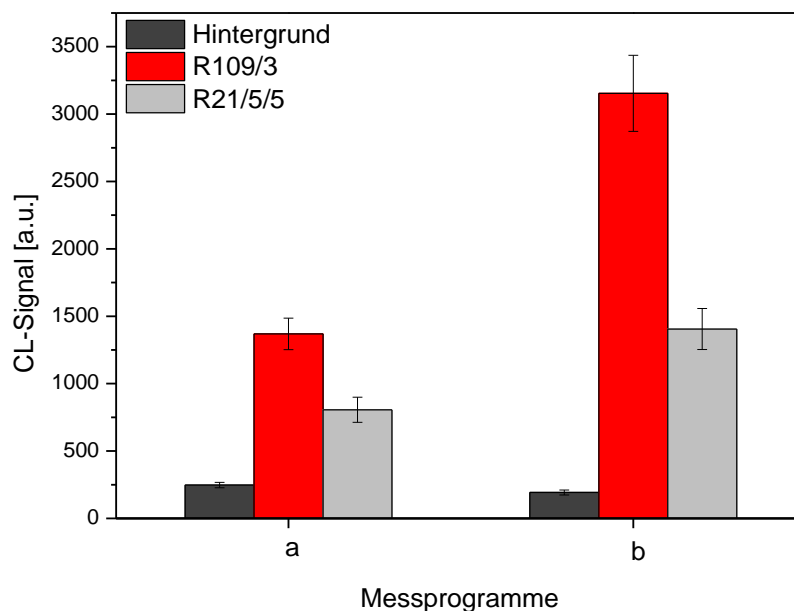


Abbildung 3.33: Vergleich zweier Messprogramme mit unterschiedlichen Flussraten ($m = 5$, $n = 2$).

3.2.4.2 Entwicklung eines Messprogramms

Sequentielle Zugabe von Analyt und Antikörper

Das in Kapitel 3.2.4.1 vorgestellte Messprogramm b, welches einer sequentiellen Zugabe aller Assay-Schritte entsprach, wurde auch für die Detektion von Rizin verwendet. Hierfür wurde zunächst Rizin mit einer kontinuierlichen Flussrate von $1 \mu\text{L/s}$ in den Mikroarray-Chip gepumpt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörpers R18/1-bio nach dem beschriebenen Stopped-Flow-Prinzip mit einer Volumeneinheit von $5 \mu\text{L}$, einer Flussrate von

1 $\mu\text{L/s}$ und einer Interaktionszeit von 10 s zwischen den jeweiligen Volumeneinheiten. Wie bei der Messung von Agglutinin betrug auch hier der Assay 1 h 15 min.

Aufgrund der geringeren, vom Robert Koch-Institut zur Verfügung gestellten Menge von Rizin wurde dieses in einer geringeren Konzentration von 500 $\mu\text{g/L}$ verglichen mit Agglutinin für die Messung eingesetzt. Auf dem Mikroarray-Chip waren die monoklonalen Antikörper R109/3, R21/5/5 und der polyklonale Antikörper RH21 immobilisiert. Auch für die Messung mit Rizin wurden nur geringe CL-Signale unter 2000 a.u. erreicht (siehe Abbildung 3.34, Messprogramm a). Eine Messung aller verwendeten Fängerantikörper im Durchfluss-System zeigte, dass wesentlich geringere CL-Signale von 600 a.u. für den polyklonalen Antikörper verglichen mit den monoklonalen von 1400 a.u. für R109/3 und von 1800 a.u. für R21/5/5 resultierten.

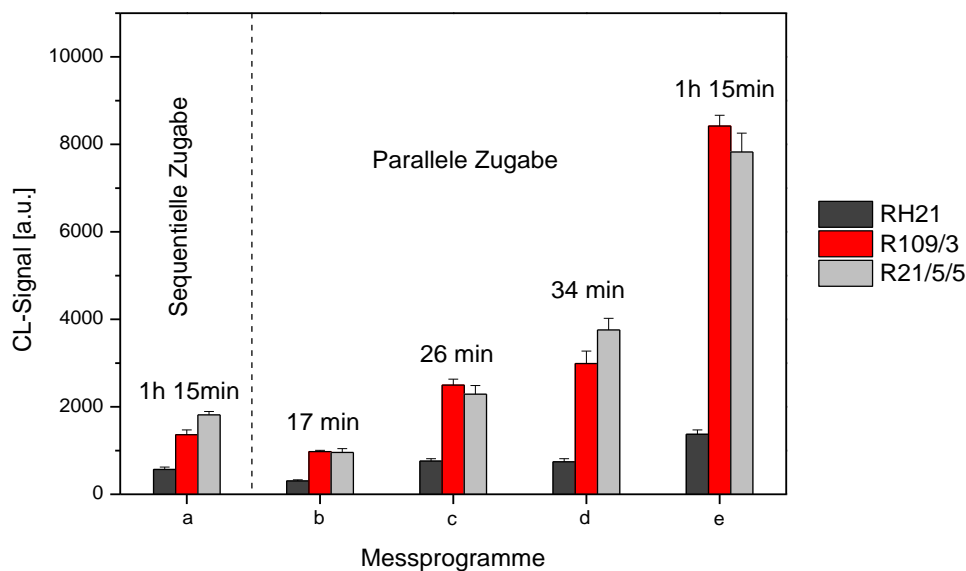


Abbildung 3.34: Vergleich der Messprogramme für eine sequentielle und parallele Zugabe von Rizin sowie des Detektionsantikörpers ($m = 5$, $n = 5$).

Parallele Zugabe von Analyt und Antikörper

Eine Assay-Dauer von 1 h 15 min ist für eine schnelle Analyse dennoch zu lang, so dass nach weiteren Möglichkeiten gesucht wurde, die Assay-Dauer weiter zu verringern. Gleichzeitig sollte die CL-Signalintensität erhöht werden, da nur geringe CL-Signale bei einer sehr hohen Konzentration von Rizin mit Messprogramm a gemessen wurden.

Daher wurde getestet, ob eine Vorinkubation der Detektionsantikörper mit dem Analyt zu einer Signalsteigerung führen könnte. Die Vorinkubation erfolgte indem Analyt und

Antikörper parallel in die Probenschleife des MCR3 abgegeben, vermischt und nach 1 min weiter in die Flusszelle gepumpt wurden. Die Messprogramme b – e in Abbildung 3.34 stellen jeweils eine parallele Zugabe von Analyt und Antikörper dar. Die genauen Daten der parallelen Zugabe dieser Messprogramme sind Tabelle 3.18 aufgelistet.

Tabelle 3.18: Parallele Zugabe von Rizin und Detektionsantikörper R18/1-bio.

Parallele Zugabe	Messprogramm	Flussrate	Assay-Dauer [min]
Kontinuierlich	b	2 $\mu\text{L/s}$	17
	c	1 $\mu\text{L/s}$	26
Stopped-Flow-Prinzip	d	50 μL , 1 $\mu\text{L/s}$, 20 s	34
	e	5 μL , 1 $\mu\text{L/s}$, 10 s	75

Das Messprogramm b lehnt an das optimierte Messprogramm für die marinen Phycotoxine an. Nach nur 17 min konnten sehr geringe CL-Signale von ca. 1000 a.u. für beide monoklonalen Antikörper detektiert werden. Das gemessene CL-Signal des polyklonalen Antikörpers war hingegen um den Faktor 3 geringer verglichen mit den monoklonalen Antikörpern.

Für Messprogramm c wurde die Flussrate für die parallele Zugabe von 2 $\mu\text{L/s}$ auf 1 $\mu\text{L/s}$ verringert. Dies führte zu einer Verlängerung des Messprogramms auf eine Dauer von 26 min. Im Vergleich zu der aufeinanderfolgenden Zugabe von Analyt und Detektionsantikörper konnten somit bei der parallelen Zugabe höhere CL-Signale bei weitaus geringeren Assay-Zeiten erzielt werden. Für beide monoklonalen Detektionsantikörper wurden CL-Signale über 2000 a.u. erhalten. Auch bei Messprogramm c war das CL-Signal des polyklonalen Antikörpers um den Faktor 3 geringer.

Bei Messprogramm b und c erfolgte die Zugabe der vorinkubierten Mischung von Analyt und Antikörper in einem kontinuierlichen Fluss. Um die Messbedingungen zusätzlich mehr an ein stationäres System anzunähern, wurde die vorinkubierte Mischung nach einem Stopped-Flow-Prinzip über den Mikroarray gepumpt. Dabei wurden zwei Messprogramme d und e verglichen, wobei die Volumeneinheiten und Interaktionszeiten bei einer gleichen Flussrate von 1 $\mu\text{L/s}$ variiert wurden.

Die höchsten CL-Signale für die monoklonalen Detektionsantikörper wurden mit Messprogramm e erreicht. Hierbei scheint eine geringere Volumeneinheit bei einer kürzeren Interaktionszeit zu höheren CL-Signalen zu führen. Um diese Aussage zu belegen, wurden im folgenden Kapitel 3.2.4.3 die Parameter Volumeneinheit, Flussrate und Interaktionszeit systematisch untersucht. Hierfür wurden nur noch die monoklonalen Antikörper verwendet, da im Vergleich zu Messprogramm a die CL-Signale mit Messprogramm e um den Faktor 6 für R109/3 auf 8400 a.u. und den Faktor 4 für R21/5/5 auf 7800 a.u. gesteigert wurden. Für den polyklonalen Antikörper RH21 wurde lediglich eine Steigerung des CL-Signals um den Faktor 2 auf 1400 a.u. erreicht.

3.2.4.3 Optimierung des Messprogramms

Basierend auf Messprogramm e wurden die Parameter Volumeneinheit, Flussrate und Stoppzeit nochmals genauer untersucht, um ein optimales Messprogramm für hochmolekulare Biotoxine zu finden. Die Konzentration von Rizin betrug 500 µg/L bei den folgenden Messungen.

Volumen

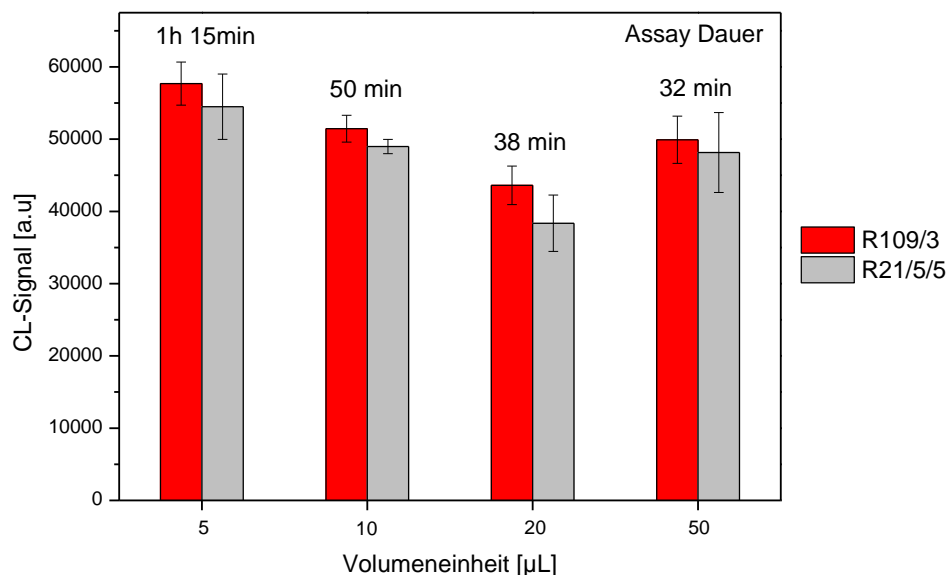


Abbildung 3.35: Variation der Volumeneinheit von 5, 10, 20 und 50 µL ($m = 5$, $n = 4$).

Das Volumen einer Flusszelle des Mikroarray-Chips beträgt 43,3 µL. Aufgrund dessen wurden Volumeneinheiten von 5, 10, 20 bis 50 µL getestet, wobei die Parameter Flussrate und Stoppzeit auf 1 µL/s und 10 s eingestellt wurden.

Im Vergleich zu den in Abbildung 3.34 für das Messprogramm e erhaltenen CL-Signale konnte hier das CL-Signale für die 5- μ L-Einheit verfünffacht werden (siehe Abbildung 3.35). Ein möglicher Grund für die Signalzunahme liegt in der Verwendung einer neuen Charge des Detektionsantikörpers. Für diese Messungen wurde der Detektionsantikörper R18/1/1-bio verwendet, der wohl weitaus affiner zu Rizin ist als der R18/1-bio. Für alle folgenden Messungen wurde jetzt der R18/1/1-bio verwendet.

Bei Variation der Volumenelemente wurde das niedrigste CL-Signal für die 20- μ L-Einheit beobachtet. Das CL-Signal der 50- μ L-Einheit lag annähernd wieder auf dem CL-Signal-Niveau der 10- μ L-Einheit. Insgesamt wurden bei jeder Volumeneinheit höhere CL-Signale mit dem Detektionsantikörper R109/3 erreicht. Da für jede Messung ein neuer Mikroarray-Chip verwendet wird, können die Schwankungen der CL-Signale auch durch die Verwendung verschiedener Chips bedingt sein.

Ein Vergleich der Volumeneinheiten 5 μ L und 50 μ L zeigte einen Abfall der CL-Signalintensität von 13,5%. Dennoch handelt es sich auch bei der 50- μ L-Einheit um sehr hohe CL-Signale von ca. 50000 a.u. Zudem konnte die Assay-Dauer von 75 min auf 32 min reduziert werden, weshalb für die folgenden Messungen eine Volumeneinheit von 50 μ L verwendet wird. Beide Flusszellen des Mikroarray-Chips besitzen ein befüllbares Volumen von 43,3 μ L, so dass mit jeder 50- μ L-Einheit Proteotoxin-reiche Volumenelemente in die direkte Umgebung der Antikörperspots nachgeliefert werden.

Geschwindigkeit der Zugabe einer Volumeneinheit

Als Nächstes wurde der Einfluss verschiedener Flussraten auf die CL-Signale untersucht. Bei einer eingestellten Interaktionszeit von 10 s und der zuvor optimierten Volumeneinheit von 50 μ L wurden die verschiedenen Flussraten von 1, 2, 5, 10 und 20 μ L/s über die Mikroarray-Chips geleitet.

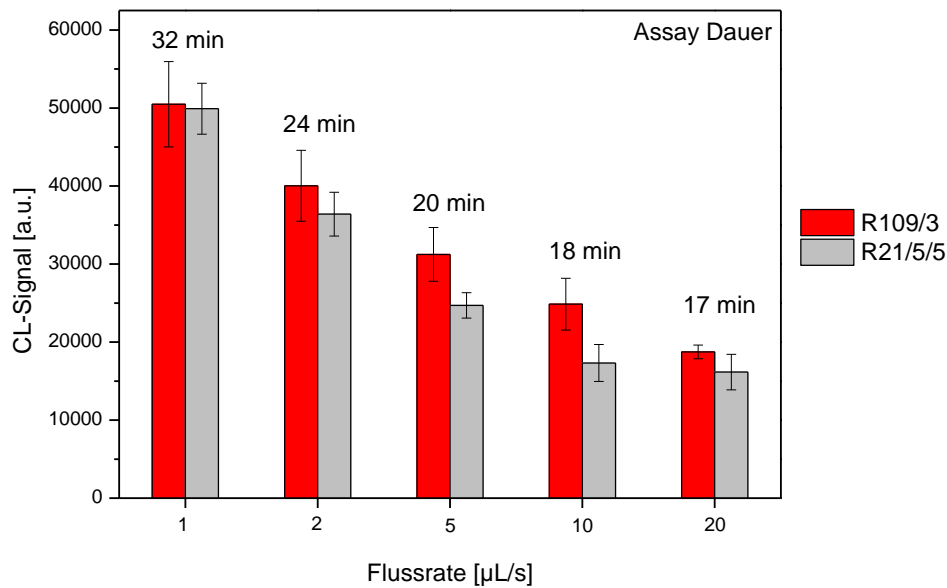


Abbildung 3.36: Variation der Flussrate von 1, 2, 5, 10 und 20 $\mu\text{L/s}$ ($m = 5$, $n = 5$).

Folgende Abhängigkeit zwischen den CL-Signalintensitäten und der Flussrate wurde beobachtet. Je schneller die Volumeneinheit über den Mikroarray-Chip gegeben wird, desto geringere CL-Signale wurden erhalten. Bei geringeren Flussraten ist die Interaktionszeit für die Bindung zwischen den Fänger- und Detektionsantikörpern zu den Analyten höher, was folglich zu höheren CL-Signalintensitäten führt. Jedoch wurde bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{L/s}$ nach 18 min ein für die weiteren Messungen ausreichend hohes CL-Signal von 24900 a.u. für R109/3 und von 17300 a.u. für R21/5/5 erreicht.

Verschiedene Interaktionszeiten

Als letzten Optimierungsschritt wurde die Interaktionszeit der Volumeneinheiten untersucht. Dabei wurden die Auswirkungen zweier verschiedener Interaktionszeiten von 5 s und 10 s bei einer Volumeneinheit von 50 μL und einer Flussrate von 10 $\mu\text{L/s}$ auf die CL-Signale getestet.

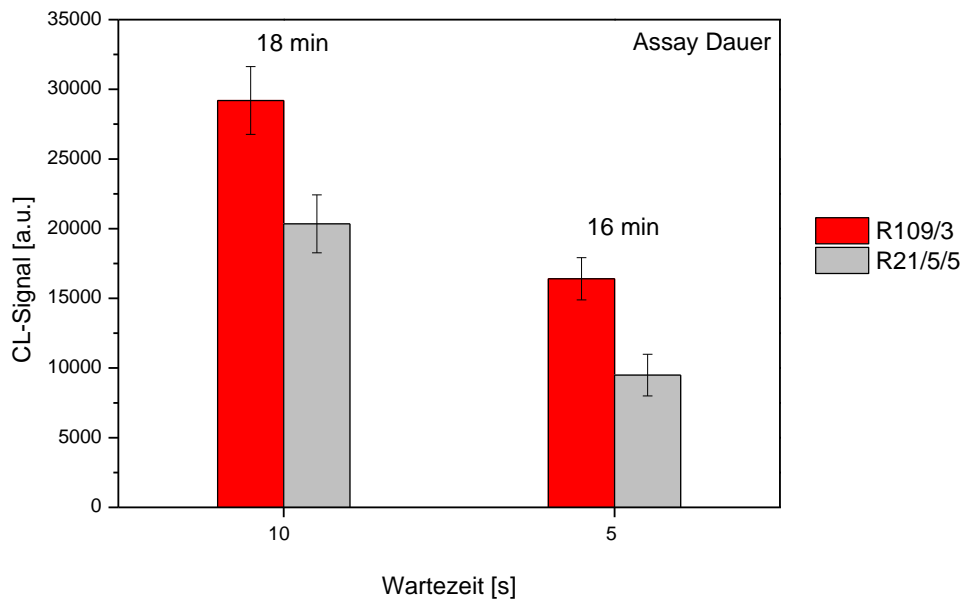


Abbildung 3.37: Variation der Interaktionszeit ($m = 5$, $n = 2$).

Eine Verkürzung der Interaktionszeit von 10 s auf 5 s pro Volumeneinheit führte zu einer Verringerung der Gesamtmessdauer von 2 min und resultierte zudem in einem CL-Signalverlust von 43,8% für R109/3 und 53,3% für R21/5/5. Im Hinblick darauf, dass für die Optimierung des Messprogramms eine hohe Konzentration von 500 $\mu\text{g/L}$ für Rizin gewählt wurde und bei den folgenden Kalibrierungen Analysen geringerer Konzentrationen gemessen werden, wird für die weiteren Messungen eine Interaktionszeit von 10 s verwendet.

Zusammengefasst bestand das endgültige, optimierte Messprogramm aus einer parallelen Zugabe bzw. Vorinkubation von Analyt und Antikörper. Jeweils 50- μL -Einheiten dieser Mischung werden nach einem Stopped-Flow-Prinzip bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{L/s}$ mit Interaktionszeiten von 10 s über den Mikroarray-Chip geleitet. Die Gesamtdauer des optimierten Messprogramms betrug demnach 18 min.

3.2.5 Anwendung der optimierten Bedingungen

3.2.5.1 Reproduzierbarkeit der Messungen

Mit dem optimierten Messprogramm wurde die Reproduzierbarkeit der Herstellung, sowie der Messung von Antikörper-Mikroarrays untersucht. Da für jede Messung ein neuer Mikroarray-Chip benötigt wird, wurde zunächst überprüft, ob mit verschiedenen Mikroarrays vergleichbare hohe CL-Signale bei identischen Messbedingungen erhalten werden. Eine

wichtige Voraussetzung für die Messung von Kalibrierkurven und die Bestimmung der korrekten Wiederfindungsraten von Kontaminationen sind reproduzierbare Messungen.

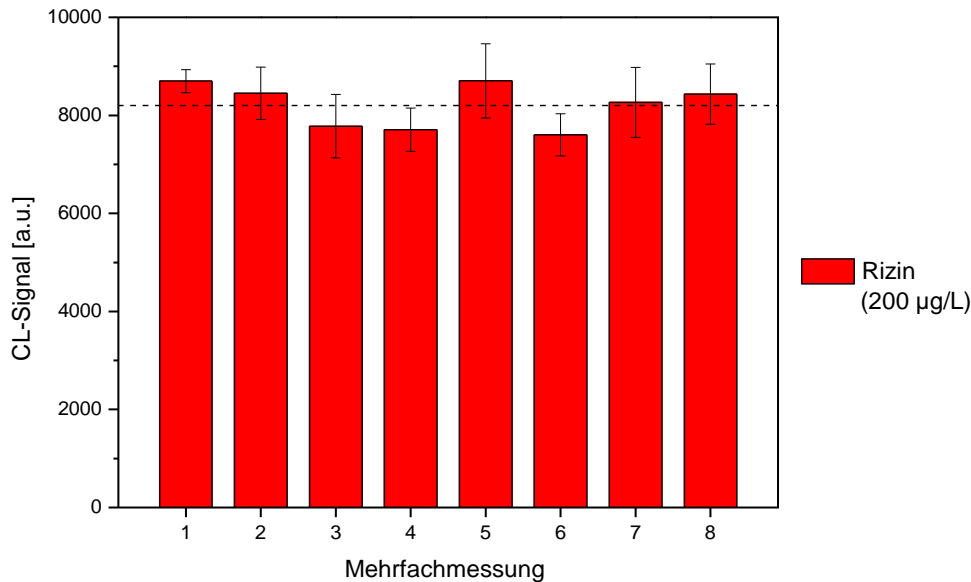


Abbildung 3.38: Bestimmung der Reproduzierbarkeit von Messungen bei einer Rizin-Konzentration von 200 µg/L und identischen Bedingungen ($m = 5$, $n = 8$).

Für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit von Messungen mit verschiedenen Mikroarrays wurde nur der Fängerantikörper R109/3 verwendet. Rizin wurde in einer Konzentration von 200 µg/L mit dem optimierten Messprogramm auf 8 verschiedenen Mikroarray-Chips gemessen. Die Messungen fanden an einem Tag statt und wurden bei identischen Messbedingungen durchgeführt.

Für die 8 Messungen wurden annähernd gleich hohe CL-Signale. Der Mittelwert dieser acht CL-Signale ist als gestrichelte Linie in Abbildung 3.38 eingezeichnet und lag bei 8200 a.u. Die Abweichung von diesem Mittelwert betrug für die gemessenen CL-Signale weniger als 7,5%. Diese geringe Abweichung zeigte eine gute Reproduzierbarkeit von Messungen mit verschiedenen Mikroarrays, die aus einer Charge stammen und am gleichen Tag und unter identischen Bedingungen gemessen wurden.

3.2.5.2 Kalibrierung von Rizin

Das optimierte Messprogramm ermöglichte die Aufnahme von Kalibrierkurven mit Rizin für die Fängerantikörper R21/5/5 und R109/3 auf der Durchfluss-Analyse-Plattform MCR3. Dazu wurden beide Antikörper auf verschiedenen Mikroarrays immobilisiert, wovon jeweils einer

für die Messung der Konzentration 0, 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 und 2000 $\mu\text{g/L}$ von Rizin verwendet wurde (siehe Abbildung 3.39).

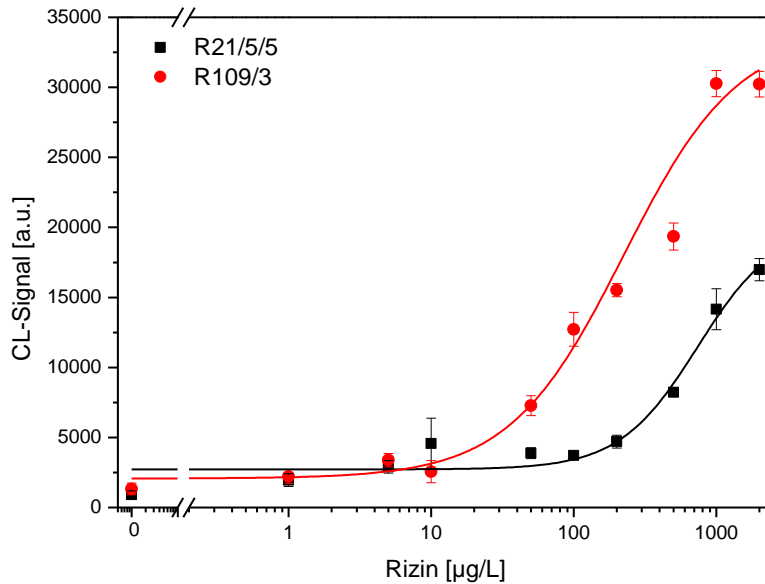


Abbildung 3.39: Kalibrierkurven ($m = 5$, $n = 10$) von Rizin für die Fängerantikörper R21/5/5 (■) und R109/3 (●).

Im Gegensatz zum Fängerantikörper R21/5/5 wurden mit dem R109/3 höhere CL-Signale erzielt, die durchschnittlich um den Faktor 2 – 3 höher waren. Lediglich der Kalibrierpunkt 500 $\mu\text{g/L}$ weicht von der Kalibrierkurve des R109/3 ab. Diese Abweichung kann mittels der geringen Schwankungen, die durch die Verwendung verschiedener Mikroarrays auftreten können, begründet werden.

Auch die Affinität des R109/3 zu Rizin scheint größer zu sein, da der Testmittelpunkt mit 224,1 $\mu\text{g/L}$ und der Arbeitsbereich mit 48,8 – 1029,8 $\mu\text{g/L}$ zu geringeren Konzentrationen verschoben sind. Für den R21/5/5 lag der Testmittelpunkt bei 740,7 $\mu\text{g/L}$. Sogar eine Konzentration von 100 $\mu\text{g/L}$ kann nicht eindeutig bei Verwendung des R21/5/5 bestimmt werden, da diese nicht mehr im Arbeitsbereich (151,6 – 1589,7 $\mu\text{g/L}$) liegt. Die Kalibrierdaten beider Fängerantikörper sind in Tabelle 3.19 gegenübergestellt.

Tabelle 3.19: Kalibrierdaten der Kalibrierkurven von Rizin mit R21/5/5 und R109/3.

Fängerantikörper	IC_{50} [$\mu\text{g/L}$]	WR (20 – 80%) [$\mu\text{g/L}$]	LOD [$\mu\text{g/L}$]
R21/5/5	740,7	192,5 – 2850,0	0,1
R109/3	224,1	48,8 – 1029,8	5,0

Aufgrund seiner höheren Sensitivität wird nur der Fängerantikörper R109/3 für die Multiplexmessungen in Kapitel 3.2.8 verwendet.

3.2.6 Kalibrierung von Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)

Wie Rizin ist auch SEB ein hochmolekulares Biotoxin, welches in einem heterogenen Sandwich-ELISA nachgewiesen wird. Somit konnte das für Rizin optimierte Messprogramm auch für die Detektion von SEB verwendet werden. Für die Kalibrierung von SEB wurden die Kalibrierstandards 0, 0,1, 1, 10, 50, 100, 500 und 1000 $\mu\text{g/L}$ in PBS angefertigt. Für den Nachweis von SEB standen drei Antikörper zur Verfügung, wobei es sich dabei um die monoklonalen Antikörper S3849/4/4/4, S1001/4/6 und S419/5/5/5 handelte. Diese Antikörper wurden in den Kalibrierungen von SEB sowohl als Fänger- wie auch als Detektionsantikörper eingesetzt, wodurch sich 6 verschiedene Möglichkeiten der Anordnung der Antikörper im Sandwich-Format ergaben. Um dieselben Antikörper auch als Detektionsantikörper verwenden zu können, war eine vorherige Markierung mit Biotin erforderlich. Die drei Kombinationen, die die sensitivsten Kalibrierkurven ergaben, sind in Abbildung 3.40 dargestellt.

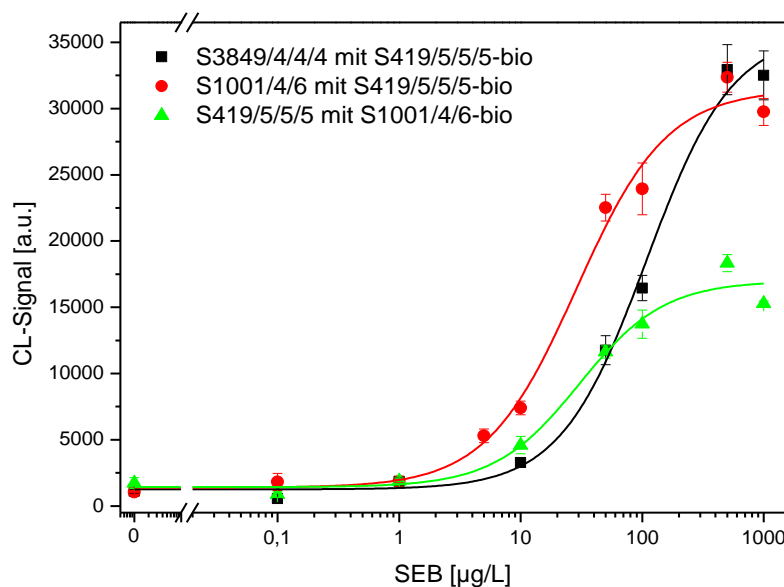


Abbildung 3.40: Kalibrierkurven von SEB mit den verschiedenen Antikörperpaaren ($m = 5$, $n = 9$).

Mit dem Antikörperpaar S3849/4/4/4 und S419/5/5/5-bio konnten die höchsten CL-Signale erzielt werden. Jedoch ist die Sensitivität für dieses Antikörperpaar geringer, da der Testmittelpunkt mit 108,2 $\mu\text{g/L}$ und der Arbeitsbereich mit 31,2 – 375,5 $\mu\text{g/L}$ verglichen mit

den anderen beiden Antikörperpaaren zu höheren Konzentrationen verschoben sind (siehe Tabelle 3.20). Für die beiden Antikörperpaare S1001/4/6 mit S419/5/5/5-bio und S419/5/5/5 mit S1001/4/6-bio lagen die Arbeitsbereiche sowie der Testmittelpunkt von 28,8 µg/L bzw. 30,3 µg/L in derselben Größenordnung. Jedoch zeigte das Antikörperpaar S1001/4/6 mit S419/5/5/5-bio (rote Kalibrierkurve) eine höhere CL-Signalintensität, die verglichen mit der grünen Kalibrierkurve um den Faktor 2 für jeden Kalibrierpunkt höher ist. Zudem konnte mit diesem Antikörperpaar eine geringere Nachweisgrenze von 0,1 µg/L erzielt werden. Somit wurde für die folgenden Multiplexmessungen in Kapitel 3.2.8 das Antikörperpaar S1001/4/6 mit S419/5/5/5-bio gewählt.

Tabelle 3.20: Kalibrierdaten der Kalibrierkurven von SEB mit verschiedenen Antikörperpaaren.

Antikörperpaare	IC ₅₀ [µg/L]	WR (20 – 80%) [µg/L]	LOD [µg/L]
S3849/4/4/4 mit S419/5/5/5-bio	108,2	31,2 – 375,5	2,4
S1001/4/6 mit S419/5/5/5-bio	28,8	7,5 – 110,0	0,1
S419/5/5/5 mit S1001/4/6-bio	30,3	7,3 – 126,0	5,0

3.2.7 Kalibrierung von Saxitoxin

Im Gegensatz zu Rizin und SEB ist Saxitoxin ein kleines Molekül, welches in einem indirekt kompetitiven ELISA-Format nachgewiesen wird. Im Kapitel 3.1 ist die Detektion von Saxitoxin neben zwei weiteren marinen Phycotoxinen Domoinsäure und Okadasäure beschrieben, wobei eine direkte Auftragung von STX auf die Oberfläche der Mikroarrays realisiert wurde. Eine weitere Möglichkeit für die Detektion von Saxitoxin stellt die Verwendung eines anti-idiotypischen Antikörpers dar. Der Arbeitskreis von Prof. Märtlbauer (LMU München) entwickelte einen anti-idiotypischen Antikörper, welcher in der Lage ist, mit seinen Bindungsregionen (Fab-Fragmente) das Zielmolekül Saxitoxin zu imitieren (siehe Abbildung 3.41).



Abbildung 3.41: Vergleich von einem gewöhnlichen Antikörper mit einem anti-idiotypischen Antikörper.

Zunächst wurde untersucht, ob eine Kalibrierung von Saxitoxin mit anti-idiotypischen Antikörpern möglich ist. Dazu wurde der anti-idiotypische Antikörper in einer Konzentration von 1 g/L auf der NHS-aktivierten Oberfläche immobilisiert. Die Saxitoxin-Kalibrierstandards 0, 0,1, 1, 5, 10, 50, 100, 200 und 500 $\mu\text{g/L}$ wurden unter Verwendung des für Rizin optimierten Messprogramms gemessen. Durch halblogarithmische Auftragung der CL-Signale gegen die gemessenen Konzentrationen wurde die resultierende Kalibrierkurve erhalten (Abbildung 3.42).

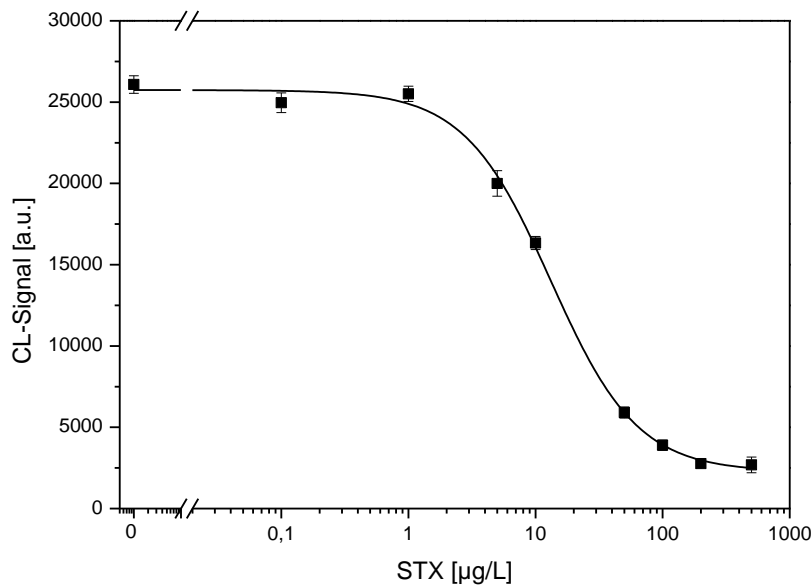


Abbildung 3.42: Kalibrierkurve von Saxitoxin ($m = 5$, $n = 9$).

Durch Kalibrierung von Saxitoxin mit anti-idiotypischen Antikörpern wurden folgende Kalibrierdaten erhalten (Tabelle 3.21). Der Testmittelpunkt (IC_{50}) lag bei 13,2 $\mu\text{g/L}$ und die Nachweisgrenze (LOD) bei 1,4 $\mu\text{g/L}$. Der festgelegte Arbeitsbereich (WR) von 20 – 80% umschloss die Konzentrationen 3,2 – 54,1 $\mu\text{g/L}$. Verglichen mit den Kalibrierdaten (Tabelle 3.6), die durch eine direkte Immobilisierung von STX auf der Mikroarray-Oberfläche erhalten wurden, sind die Werte für die Kalibrierung mit anti-idiotypischen Antikörpern zu höheren

Konzentrationen verschoben. Hierfür können mehrere Gründe angeführt werden wie die Verwendung des anti-idiotypischen Antikörpers, des SA-PolyHRP40-Konjugats oder eines anderen Messprogramms. Zudem wurde auch ein anderer Antikörper, nämlich der Biotin-markierte Detektionsantikörper aus dem Arbeitskreis von Prof. Märtlbauer eingesetzt. Dennoch sind diese Kalibrierdaten für die Analyse von beispielsweise kontaminierten Muschelproben ausreichend, da anhand von Verdünnungsfaktoren (die Konzentration der Muschelprobe) auf den notwendigen Arbeitsbereich eingestellt werden kann.

Tabelle 3.21: Kalibrierdaten von Saxitoxin mit anti-idiotypischen Antikörpern.

	IC ₅₀ [µg/L]	WR (20 – 80%) [µg/L]	LOD [µg/L]
Saxitoxin	13,2	3,2 – 54,1	1,4

Die Verwendung von anti-idiotypischen Antikörpern stellt dennoch einen ersten Schritt für eine erfolgreiche Zusammenführung verschiedener Assay-Prinzipien auf dem Antikörper-Mikroarray dar. Die Immobilisierung von anti-idiotypischen Antikörpern bietet den Vorteil, dass die gleiche Oberflächenaktivierung (NHS), die gleichen Inkubationsbedingungen (4°C über Nacht) und Blocking-Bedingungen verwendet werden können.

3.2.8 Multiplexmessungen von Rizin, Staphylococcus Enterotoxin B und Saxitoxin

3.2.8.1 Kombination verschiedener Assay-Prinzipien

Ein erster Schritt in Richtung der Vereinigung von den verschiedenen Assay-Prinzipien Sandwich-Immunoassay und indirekt kompetitiver Immunoassay war durch die Verwendung von anti-idiotypischen Antikörpern gelegt. Dadurch wurde ein Antikörper-Mikroarray, auf dem die Fängerantikörper anti-Rizin (R109/3) und anti-SEB (S1001/4/6) zusammen mit dem anti-idiotypischen Antikörper immobilisiert waren, erhalten.

Der nächste Schritt für die Zusammenführung wurde realisiert durch das für Rizin entwickelte Messprogramm. Der Kernpunkt dieses Messprogramm basierte auf der gleichzeitigen Zugabe von Analyten und Antikörpern in die Inkubationsschleife des MCR3, wo die Mischung für 1 min vorinkubiert, bevor diese über den Mikroarray-Chip geleitet wurde. Für alle Biotoxine wurde die Inkubationszeit von 1 min verwendet, um zunächst eine Bindung zu den Biotin-markierten Detektionsantikörpern zu erreichen. Anschließend kommt es durch das optimierte Messprogramm zur Bindung zu den Fängerantikörpern für Rizin und SEB. Für STX kommt

es hingegen im Mikroarray-Chip zu einer Konkurrenz zwischen den freien Saxitoxin-Molekülen mit den anti-idiotypischen Antikörpern um die Biotin-markierten Antikörper. An alle Biotin-markierten Antikörper wird das SA-PolyHRP40-Konjugat gebunden, welches eine Signalamplifizierung durch die Zugabe von Luminol und Wasserstoffperoxid ermöglicht. Die Lichtintensitäten werden dabei von einer CCD-Kamera aufgenommen.

Da das optimierte Messprogramm nach dem Ablauf der Zugaben für einen indirekt kompetitiven Immunoassay verläuft, waren beide Assay-Prinzipien ohne großen Aufwand auf der Durchfluss-Analyse-Plattform MCR3 kombinierbar. Der schlussendliche Messablauf ist schematisch in Abbildung 3.43 visualisiert.

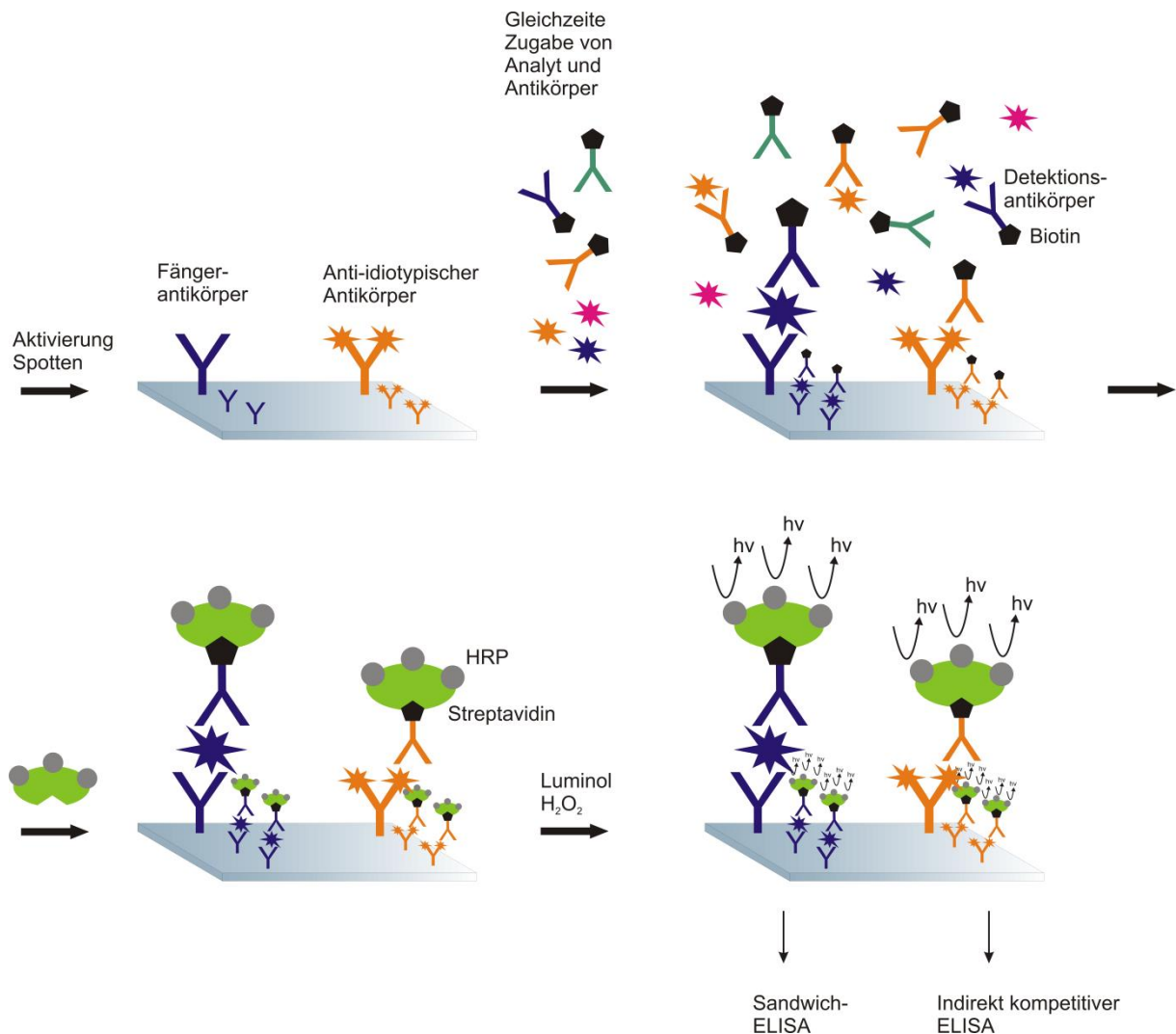


Abbildung 3.43: Kombination zweier Assay-Prinzipien - Sandwich Immunoassay und indirekt kompetitiver Immunoassay.

3.2.8.2 Untersuchung der Reproduzierbarkeit von Multiplex-Messungen

Die Untersuchung der Reproduzierbarkeit von Multiplex-Messungen der Biotoxine Rizin, SEB und STX erfolgte zunächst durch die Verwendung einer Konzentration. Für die gleichzeitige Detektion wurde Rizin in einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/L}$, SEB in 100 $\mu\text{g/L}$ und Saxitoxin in 10 $\mu\text{g/L}$ gemessen, wobei für jede Messung ein neuer Mikroarray-Chip verwendet wurde.

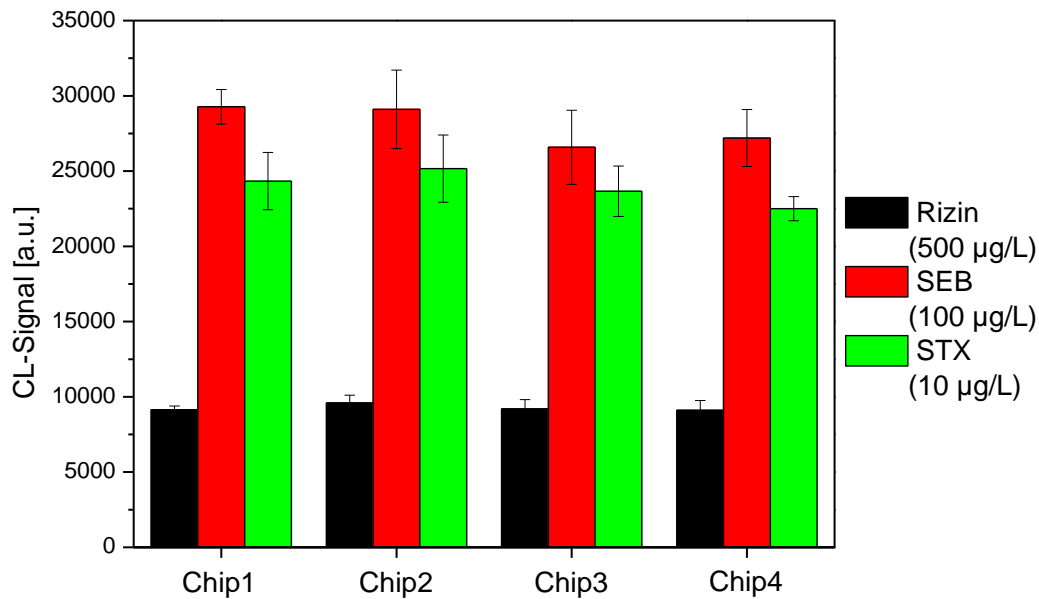


Abbildung 3.44: Reproduzierbarkeit von Multiplex-Messungen ($m = 5$, $n = 4$).

Auf den 4 getesteten Antikörper-Mikroarrays wurden stabile CL-Signalintensitäten erhalten. Mittelwerte der CL-Signale von 9300 ± 200 a.u. für Rizin, 28000 ± 1400 a.u. für SEB und 24000 ± 1100 a.u. für Saxitoxin wurden berechnet. Die gemittelte Abweichung der einzelnen CL-Signale betrug dabei 1,8% für Rizin, 4,1% für SEB und 3,5% für STX. Die Inter-Chipvarianz wurde zu 2,4% für Rizin, 4,8% für SEB und 4,7% für STX bestimmt. Für die gemittelte Inter-Spotvarianz der 4 getesteten Antikörper-Mikroarrays wurden 5,5% für Rizin, 7,3% für SEB und 6,8% für STX berechnet. Wie schon in Kapitel 3.2.5.1 für Messungen von Rizin gezeigt, wurden auch für die Multiplex-Messungen reproduzierbare Resultate erhalten. Somit konnte bewiesen, dass eine parallele Messung von Analyten verschiedener molarer Massen möglich ist.

3.2.8.3 Multiplex-Kalibrierungen

Für die Messung der Multiplex-Kalibrierungen wurden die Kalibrierstandards 0, 0,1, 1, 5, 10, 50, 100, 200 und 500 $\mu\text{g/L}$ für alle Biotoxine in PBS hergestellt. Für SEB wurde zusätzlich die Konzentration 1000 $\mu\text{g/L}$ gemessen und bei Rizin die Konzentrationen 1000 und 2000 $\mu\text{g/L}$. Die verwendeten Antikörper-Mikroarrays stammten aus einer Produktionscharge. Die Messungen wurden jeweils an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt, um ähnliche Messbedingungen zu gewährleisten. Um die Reproduzierbarkeit der Kalibrierungen besser darzustellen, wurden alle Kalibrierkurven in Abbildungen 3.45 – 3.47 normiert aufgetragen, wobei m der Anzahl der Messpunkte und n der Anzahl der Messungen entspricht. Aufgrund der verschiedenen Kalibrierstandards beträgt n für Rizin 11, für SEB 10 und für STX 9.

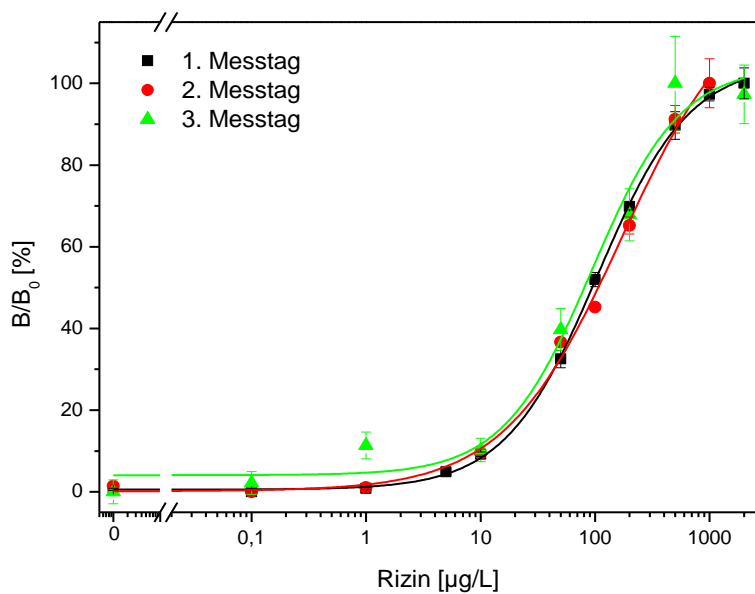


Abbildung 3.45: Multiplex-Kalibrierkurven von Rizin ($m = 5$, $n = 11$).

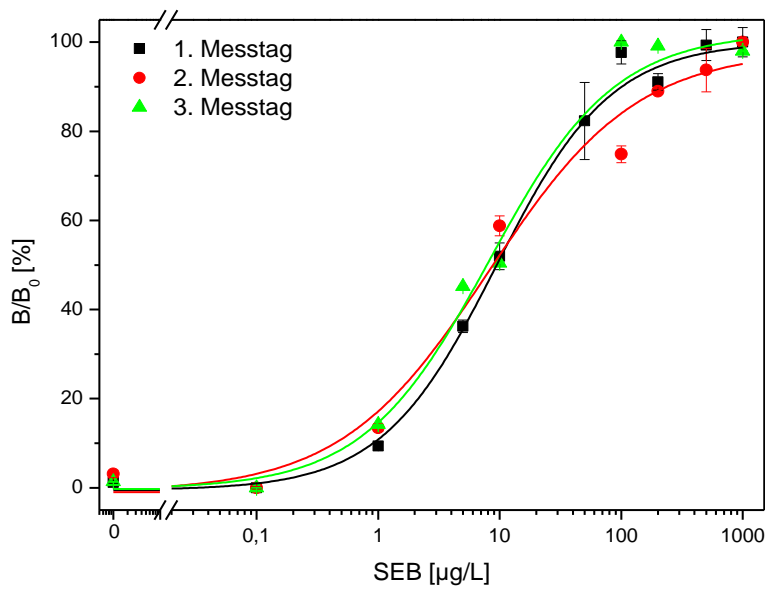


Abbildung 3.46: Multiplex-Kalibrierkurven von SEB ($m = 5$, $n = 10$).

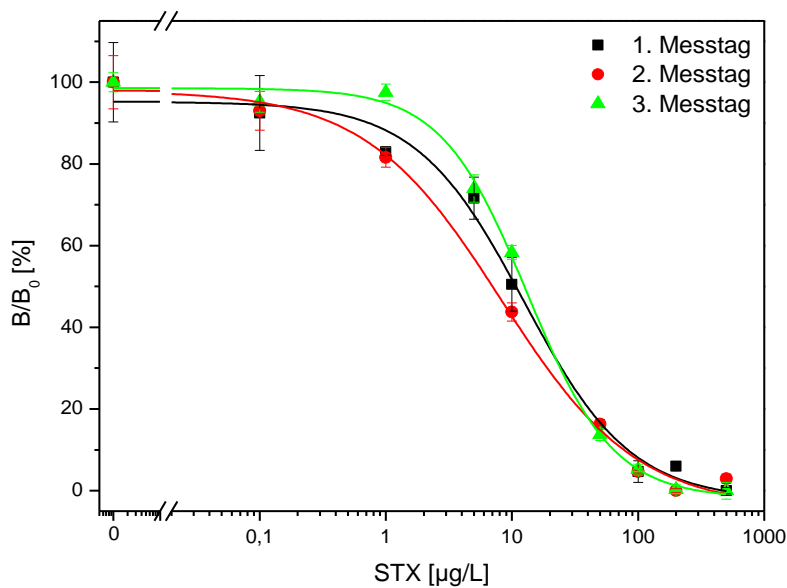


Abbildung 3.47: Multiplex-Kalibrierkurven von STX ($m = 5$, $n = 9$).

Die erhaltenen Kalibrierdaten der Multiplex-Messungen der Biotoxine Rizin, SEB und STX sind in Tabelle 3.22 aufgeführt. Insgesamt wurden für Rizin mit einem Testmittelpunkt von $93,7 \mu\text{g/L}$, einem Arbeitsbereich von $23,8 - 301,9 \mu\text{g/L}$ und einer Nachweisgrenze von $2,9 \mu\text{g/L}$ geringere $\mu\text{g/L}$ -Werte im Vergleich zu der Einzel-Kalibrierung (siehe Tabelle 3.19)

erhalten. Derselbe Trend, nämlich die Verschiebung der Kalibrierdaten zu geringeren $\mu\text{g/L}$ -Werten wurde auch für SEB beobachtet. Für die Multiplex-Kalibrierdaten von SEB wurde ein Testmittelpunkt von $8,7 \mu\text{g/L}$, ein Arbeitsbereich von $1,7 - 48,6 \mu\text{g/L}$ und eine Nachweisgrenze von $0,1 \mu\text{g/L}$ erreicht. Lediglich bei STX verhielten sich die Multiplex-verglichen zu den Einzel-Kalibrierdaten (siehe Tabelle 3.21) in einem ähnlichen $\mu\text{g/L}$ -Bereich mit einem Testmittelpunkt von $10,1 \mu\text{g/L}$, einem Arbeitsbereich von $2,6 - 37,2 \mu\text{g/L}$ und einer Nachweisgrenze von $2,3 \mu\text{g/L}$.

Tabelle 3.22: Multiplex-Kalibrierdaten der Biotoxine Rizin, SEB und STX.

Toxin	IC ₅₀ [$\mu\text{g/L}$]	WR (20 – 80%) [$\mu\text{g/L}$]	LOD [$\mu\text{g/L}$]	CV [%]
Rizin	$93,7 \pm 13,1$	$23,8 \pm 2,7 - 301,9 \pm 43,8$	$2,9 \pm 3,1$	13,9
SEB	$8,7 \pm 0,8$	$1,7 \pm 0,4 - 48,6 \pm 15,2$	$0,1 \pm 0,1$	9,3
STX	$10,1 \pm 2,8$	$2,6 \pm 1,5 - 37,2 \pm 3,3$	$2,3 \pm 1,7$	28,0

Um die drei Kalibrierkurven jeweils eines Biotoxins zu vergleichen, wurde für jedes Biotoxin der Variationskoeffizient (CV) bzw. die Interassay-Varianz aus den Mittelwerten der IC₅₀-Werte von den drei Multiplex-Kalibrierkurven berechnet. Für Rizin betrug somit der Variationskoeffizient 13,9%, für SEB 9,3% und für STX 28,0%. Da für jede Messung ein neuer Mikroarray-Chip genommen, können einzelne abweichende Kalibrierdaten im Bereich der Arbeitsbereiche für hohe Variationskoeffizienten verantwortlich sein. Prinzipiell zeigen die Multiplex-Kalibrierkurven jedoch eine gute Reproduzierbarkeit. Ob die Reproduzierbarkeit der Multiplexmessungen ausreichend ist, wird im Folgenden anhand von Wiederfindungsmessungen untersucht.

Im Vergleich zu den in Tabelle 3.6 bestimmten Variationskoeffizienten von 4,9% liegt der hier für STX berechnete deutlich höher mit 28,0%. Aber auch die weiteren Kalibrierdaten wie Testmittelpunkt, Arbeitsbereich und Nachweisgrenze weisen höhere Werte auf. Obwohl es sich beim Assay-Prinzip für beide Varianten um einen indirekt kompetitiven Immunoassay handelt, resultiert die Verwendung eines anti-idiotypischen Antikörpers in der Verschiebung der Kalibrierung zu höheren Werten.

3.2.8.4 Wiederfindung

Für die Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden die drei Biotoxine zunächst wie im vorherigen Kapitel 3.2.8.3 beschrieben, gleichzeitig kalibriert und anschließend die Proben gemessen. In Abbildung 3.48 ist die Kalibrierkurve für Rizin in schwarz, für SEB in rot und für STX in grün dargestellt. Als Proben wurden die Konzentrationen 10 $\mu\text{g/L}$ und 100 $\mu\text{g/L}$ in PBS gewählt, die jeweils zweimal hintereinander analysiert wurden. Die insgesamt vier Proben wurden für Rizin in grau, für SEB in gelb und für STX in blau in Abbildung 3.48 eingezeichnet, wobei ersichtlich ist, dass die CL-Signale der Probenmessung sehr gut mit den Kalibrierkurven übereinstimmen.

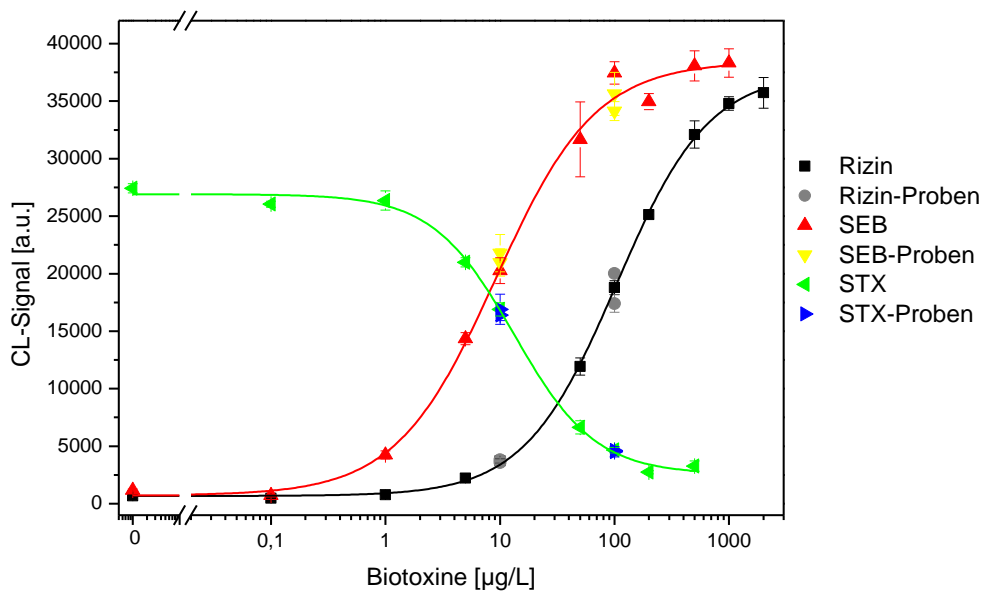


Abbildung 3.48: Multiplex-Kalibrierkurven von Rizin (\blacksquare) $m = 5$, $n = 11$), SEB (\blacktriangle) $m = 5$, $n = 10$) und STX (\blacktriangleleft) $m = 5$, $n = 9$) mit eingezeichneten Wiederfindungsraten.

In der folgenden Tabelle 3.23 sind die genauen Werte der gemessenen Wiederfindungsraten angegeben. Eine gemittelte Wiederfindungsrate für Rizin von 11,1 $\mu\text{g/L}$ für die Probe mit der Konzentration 10 $\mu\text{g/L}$ und 100,9 $\mu\text{g/L}$ für die Probe mit 100 $\mu\text{g/L}$ wurde bestimmt. Vergleichbar gute Wiederfindungen wurden auch für SEB mit 11,1 $\mu\text{g/L}$ und 92,5 $\mu\text{g/L}$ sowie für STX mit 10,2 $\mu\text{g/L}$ und 94,5 $\mu\text{g/L}$ erhalten.

Tabelle 3.23: Wiederfindungsraten für Rizin, SEB und STX.

Eingesetzte Menge	Wiederfindung Rizin		Wiederfindung SEB		Wiederfindung STX	
	[µg/L]	[%]	[µg/L]	[%]	[µg/L]	[%]
10	10,7	106,6	10,6	106,5	9,8	98,6
10	11,5	115,3	11,6	116,3	10,6	105,9
Mittelwert	11,1 ± 0,6	110,9 ± 6,2	11,1 ± 0,7	111,4 ± 6,9	10,2 ± 0,5	102,3 ± 5,1
100	87,6	87,6	113,7	113,7	97,0	97,0
100	114,1	114,1	71,4	71,4	92,5	92,5
Mittelwert	100,9 ± 18,6	100,9 ± 18,6	92,5 ± 29,9	92,5 ± 29,9	94,5 ± 3,2	94,5 ± 3,2

Zusammenfassung und Fazit

Für die biologischen Kampfstoffe wurde ein Antikörper-Mikroarray entwickelt, der eine parallele Detektion von Biotoxinen mit stark unterschiedlichen Molekulargewichten ermöglicht. So können neben hochmolekularen Proteotoxinen wie Rizin und SEB auch niedermolekulare Phycotoxine wie STX analysiert werden. Realisiert wurde der Antikörper-Mikroarray bzw. die parallele Detektion zum einen durch die Verwendung eines anti-idiotypischen Antikörpers als Ersatz für das niedermolekulare STX und zum anderen durch das optimierte Messprogramm. Dieses beinhaltet eine parallele Zugabe von Analyten und Antikörpern nach einem Stopped-Flow-Prinzip und ermöglichte so die Kombination der beiden Assay-Prinzipien, dem indirekt kompetitiven Immunoassay und dem Sandwich-Immunoassay. Die Multiplex-Kalibrierungen dieser Toxine, die an drei verschiedenen Tagen aufgenommen wurden, zeigten eine gute Reproduzierbarkeit, so dass die Verwendung jeweils eines neuen Chips für die verschiedenen Kalibrierpunkt möglich ist. Die erreichten Nachweisgrenzen von 3 µg/L für Rizin und 0,1 µg/L für SEB liegen im unteren µg/L-Bereich und sind vergleichbar mit den in Tabelle 2.9 zusammengefassten Nachweisgrenzen. Mit dem entwickelten Antikörper-Mikroarray wurden sehr gute Wiederfindungsraten in Puffer erzielt, wobei die Werte für alle Proben um 100% Wiederfindung lagen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Biotoxine, die durch natürlich bedingte oder vorsätzliche Kontamination in Wasser und Lebensmitteln auftreten können, stellen ein permanentes Gefährdungspotenzial für den Menschen dar. Beispiele für natürliche Kontaminationen sind Phycotoxine, die durch verschiedene Algenarten produziert werden und sich im Gewebe lebender Muscheln anreichern. Je nach äußeren Gegebenheiten können sehr hohe Konzentrationen an Phycotoxinen in Muschelfleisch erreicht werden, wobei kontaminierte Muscheln von unbelasteten nicht an ihren äußeren Merkmalen unterschieden werden können. Der Verzehr kontaminierter Muscheln führt beim Menschen zu schweren Vergiftungssymptomen, die in sehr seltenen Fällen tödlich enden können. Um den Menschen vor Muschelvergiftungen zu schützen, wurden durch eine EU-Verordnung maximal zulässige Grenzwerte von Phycotoxinen in Muschelfleisch festgelegt. Die Höchstgehalte pro Kilogramm Muschelfleisch liegen dabei für ASP-Toxine bei 20 mg Domoinsäure-(DA)-Äquivalenten, für DSP-Toxine bei 160 µg Okadasäure-(OA)-Äquivalenten und für PSP-Toxine bei 800 µg Saxitoxin-(STX)-Äquivalenten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Durchfluss-Chemilumineszenz-(CL)-Mikroarrays zur ständigen Überwachung der Grenzwerte von marinen Biotoxinen in lebenden Speisemuscheln entwickelt. Diese Mikroarrays werden auf einer portablen Mikroarray-Auslese-Plattform MCR3 (*Munich Chip Reader*) ausgelesen. Im Gegensatz zu den klassischen immunologischen Systemen wie ELISA bietet der MCR3 als ein automatisiertes mikrofluidisches System, eine schnelle, sensitive und parallele Identifizierung und Quantifizierung von verschiedenen Analyten aus nur einer einzigen Probe. Die wichtigsten Schritte zur Realisierung des Phycotoxin-Mikroarrays sind im Folgenden zusammengefasst.

Für einen simultanen Nachweis von DA, OA und STX wurden diese Phycotoxine direkt auf einer EpoxyPEG-aktivierten Glasoberfläche aufgetragen. Die Inkubation der Phycotoxine auf EpoxyPEG-aktivierten Chipoberflächen bei 25°C und einer Luftfeuchtigkeit von 55% führte zu homogenen, runden und scharf abgegrenzten Spots und zeigte zudem die höchsten CL-Signalintensitäten. Die Phycotoxine wurden dabei nach einem bestimmten Array-Muster aufgetragen, welches pro Toxin 3 Reihen mit jeweils 5 Replikaten enthielt. Aus den mehrfach aufgetragenen Spots auf einem Mikroarray wurde über einen Vergleich der Varianzen der CL-Signale in x- und y-Richtung sichergestellt, dass weder der Spottingprozess noch die Flussrichtung einen Einfluss auf die CL-Signale zeigte.

Bei den marinen Biotoxinen handelte es sich um kleine Moleküle (< 1 kDa), so dass als Testprinzip ein indirekt kompetitiver Immunoassay angewandt wurde. Für die praktische Durchführung dieses Testprinzips auf der Durchfluss-Analyse-Plattform MCR3 wurde zunächst ein Messprogramm entwickelt. Hierfür wurden die Flussraten der Zugabe der primären und der sekundären Antikörper variiert sowie verschiedene Verdünnungsverhältnisse der primären Antikörper getestet. Im Hinblick auf die Assay-Dauer, die CL-Signalintensitäten und den Antikörperverbrauch wurde eine Flussrate von $2 \mu\text{L/s}$ für die primären Antikörper bei einer Verdünnung von 1:4000 ($0,25 \mu\text{g/L}$) gewählt. Für die sekundären Antikörper wurde eine Flussrate von $5 \mu\text{L/s}$ verwendet. Die Gesamtdauer des optimierten Messprogramms inklusive des Regenerationsschrittes lag somit bei 20 min.

Für die Regeneration der Mikroarray-Oberfläche wurde ein SDS-HCl-Puffer bei pH 3 verwendet. Innerhalb von 25 Regenerationszyklen wurde eine lineare CL-Signalabnahme für DA und OA beobachtet. Der CL-Signalabfall für STX hingegen war exponentiell. Nach 25 durchgeführten Regenerationszyklen betragen die normierten CL-Signalabnahmen $48,0 \pm 5,6\%$ für DA, $76,0 \pm 2,1\%$ für OA und $23,3 \pm 1,0\%$ für STX. Aufgrund des CL-Signalabfalls wurde eine genaue Messstrategie für alle Mikroarray-Chips definiert, um die Effekte der direkten Immobilisierungsstrategie und somit der Regeneration auf die internen Kalibrierungen und Wiederfindungsraten zu untersuchen. Dazu wurden Einzel- ($n = 7, m = 1$) und Multiplex-Kalibrierungen ($n = 7, m = 3$) der marinen Biotoxine in Puffer aufgenommen, wobei Nachweisgrenzen von $1,2 \pm 0,6 \mu\text{g/L}$ für DA, $1,3 \pm 0,5 \mu\text{g/L}$ für OA und $1,0 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$ für STX erhalten wurden. Anhand des geringen Variationskoeffizienten von $< 10\%$, berechnet aus den Testmittelpunkten der Multiplex-Kalibrierungen, wurde eine hohe Reproduzierbarkeit der Kalibrierungen von Phycotoxinen auf verschiedenen Mikroarray-Chips und an verschiedenen Tagen bewiesen.

Ohne die Einführung mathematischer Korrekturen des CL-Signalabfalls resultierten die Wiederfindungsraten aller dotierten Proben in einer Überbestimmung von mehr als 200%. Um die CL-Signale zu korrigieren, wurden zwei Korrekturmethode eingeführt. Mit Korrekturmethode I wurde der CL-Signalabfall über die in der Messstrategie eingeführten Blankmessungen korrigiert und führte zu Wiederfindungsraten von 86,2% für DA, 102,5% für OA und 61,6% für STX in Puffer. Insgesamt wurden verlässliche Wiederfindungen um 100% für DA und OA mit Korrekturmethode I erhalten, was eine parallele Quantifizierung dieser Phycotoxine in dotierten Proben ermöglichte. Im Gegensatz dazu führte der nicht linear verlaufende CL-Signalabfall für STX zu einer Unterbestimmung der Proben. Auch für Korrekturmethode II, die auf der Anwendung von Korrekturfaktoren basierte, welche über die

Blankmessungen berechnet wurden, wurden gute Wiederfindungsraten für OA und DA erhalten. Für STX resultierte jedoch eine Überstimmung der Proben. Beide Korrekturmethode müssen in weiterführenden Arbeiten weiter verbessert werden, um eine genaue quantitative Bestimmung von STX zu ermöglichen. Für die Bestimmung der Wiederfindungsraten der Muschelproben wurde Korrekturmethode I verwendet.

Für die Analyse von kontaminierten Muschelproben wurde eine Methanol-Wasser-Mischung (1/1) als Extraktionspuffer für alle drei Phycotoxine identifiziert. Die Muschelproben wurden aufbereitet, indem jeweils 5 mL des Extraktionspuffers zu 1 g Muschelfleisch gegeben wurden. Die anschließende Verdünnung des Extraktes mit PBS wurde so eingestellt, dass die Quantifizierung der Muschelproben direkt an den Grenzwerten der einzelnen Phycotoxine erfolgen konnte. Die dafür bestimmten Verdünnungsfaktoren waren 1/667 DA, 1/9 für OA und 1/50 für STX. Gemäß diesen Verdünnungsfaktoren wurde für jedes Phycotoxin eine Kalibrierung in Muschelmatrix durchgeführt. Dabei wurden vergleichbare Nachweisgrenzen wie in Puffer von $0,5 \pm 0,3 \mu\text{g/L}$ für DA, $1,0 \pm 0,6 \mu\text{g/L}$ für OA und $0,4 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$ für STX erhalten. Folglich können Kalibrierungen und Qualifizierungen für den Nachweis von Phycotoxinen in Muschelproben ebenfalls parallel durchgeführt werden. Jedoch müssen für eine genaue quantitative Analyse von dotierten bzw. kontaminierten Muschelproben die für jedes Phycotoxin benötigten Verdünnungsfaktoren angewandt werden. Die erhaltenen Wiederfindungen der dotierten Proben in Muschelfleisch betragen 82,3% für DA, 146,8% für OA und 61,2% für STX und liegen somit in einem ähnlichen Bereich wie die Wiederfindungsraten in Puffer. Die generierten Messbereiche für die einzelnen Phycotoxine liegen innerhalb der maximal zulässigen Grenzwerte, so dass Überschreitungen dieser Grenzwerte mit dem Phycotoxin-Mikroarray festgestellt werden können. Für die kontaminierten Muschelproben war jedoch aufgrund vorhandener Analoga nur eine qualitative Analyse der drei Phycotoxine möglich.

Die Vorteile des hier entwickelten Durchfluss-Chemilumineszenz-Systems MCR3 liegen in der gleichzeitigen Detektion verschiedener Phycotoxine in Puffer (PBS), wodurch Messzeiten und Kosten gespart werden können. Ferner eignet sich der MCR3 auch zum Einsatz für Vor-Ort-Analysen. Der Phycotoxin-Mikroarray kann zudem durch direkte Auftragung weiterer Phycotoxine auf der Chip-Oberfläche einfach erweitert werden. In weiterführenden Arbeiten wäre somit die Erweiterung des Phycotoxin-Mikroarrays auf weitere Toxinfamilien wünschenswert. Auch die Analyse weiterer Muschelproben mit verschiedenen Toxizitätsprofilen wäre von Interesse. Bei ausreichender Verfügbarkeit aller Analoga könnte zudem eine Bestimmung der vorhandenen Kreuzreaktivitäten aller Antikörper durchgeführt

werden. Abschließend wäre für eine Validierung dieser Methode gemäß der 2002/657/EC zum Screening für Phycotoxine die Bestimmung der Entscheidungsgrenze CC α und des Nachweisvermögens CC β notwendig.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines antikörperbasierten Multiplex-Detektionssystem für Biotoxine, deren Einsatz bei einer vorsätzlichen Kontamination von Nahrungsmitteln, Trinkwasser oder Luft als wahrscheinlich gilt. Die hierfür untersuchten Analyte waren zum einen hochmolekulare Proteotoxine wie das Pflanzentoxin Rizin (60 kDa) sowie das Bakterientoxin Staphylococcal Enterotoxin B (SEB, 30 kDa), zum anderen das von marinen Mikroalgen (Dinoflagellaten) produzierte Saxitoxin (STX, 0,3 kDa).

Die Schwierigkeit bei der Entwicklung eines Sandwich-Immunoassays zur Detektion von Rizin bestand in der Generierung von ausreichend hohen CL-Signalintensitäten in den Messungen. Dazu wurden zunächst die Einflussfaktoren auf die CL-Signalintensität in stationären Systemen untersucht und anschließend auf die Durchfluss-Mikroarray-Plattform MCR3 übertragen. Zusammengefasst wurde die Amplifizierung des CL-Signals durch die Verwendung von SA-PolyHRP40 und Rizin selbst (anstatt Agglutinin) erreicht. Zudem konnte die Bindung von Rizin mit dem Detektionsantikörper als zeitintensivster Schritt im Assay identifiziert werden. Im Gegensatz zu einer sequentiellen Zugabe führte die parallele Zugabe von Analyten und Detektionsantikörpern einerseits in die Inkubationsschleife des MCR3 und andererseits in die Mikroarray-Chips zu einer erheblichen CL-Signalzunahme. Die CL-Signale konnten zudem durch eine Stopped-Flow-Zugabe der Analyt-Antikörper-Mischung im Vergleich zu einer kontinuierlichen Zugabe nochmals erhöht werden. Die Analyt-Antikörper-Mischung wird dabei mit einer Flussrate von 10 μ L/s und in 50- μ L-Einheiten dem Mikroarray-Chip zugeführt. Die optimale Interaktionszeit pro Volumenelement betrug dabei 10 s. Die Gesamtdauer des optimierten Messprogramms lag somit bei 18 min. Im Vergleich zu den Phycotoxinen muss bei der Detektion von proteinogenen Biotoxinen wie z.B. Rizin für jede Messung ein neuer Antikörper-Mikroarray verwendet werden, da eine Regeneration der Fängerantikörper ohne große CL-Signalverluste nicht möglich war. Die Reproduzierbarkeit von Messungen mit jeweils einem neuen Chip wurde gewährleistet, indem eine Konzentration von Rizin auf mehreren Mikroarrays einer Charge gemessen wurde und die CL Signale in geringen Abweichungen (< 7,5%) resultierten. Durch die Verwendung des Fängerantikörpers R109/3 und des Detektionsantikörpers

R18/1/1-bio wurde schließlich die sensitivste Kalibrierkurve mit einem Testmittelpunkt von 224,1 µg/L und einer Nachweisgrenze von 5,0 µg/L erhalten.

Das für Rizin optimierte Messprogramm wurde auch für die Detektion von SEB angewandt. Hierfür standen drei monoklonale Antikörper zur Verfügung, die jeweils als Fänger- und Detektionsantikörper getestet wurden. Mit dem Fängerantikörper S1001/4/6 und dem Detektionsantikörper S419/5/5/5-bio resultierte die sensitivste Kalibrierkurve mit einem Testmittelpunkt von 28,8 µg/L und einer Nachweisgrenze von 0,1 µg/L.

Die gleichzeitige angestrebte Detektion von Analyten wie Rizin und SEB mit STX stellte eine große Herausforderung dar, da Biotoxine unter 1 kDa mittels indirekt kompetitiven Immunoassays nachgewiesen werden. Hingegen können Analyte, die eine größere molare Masse aufweisen, mittels Sandwich-ELISA identifiziert werden. Der erste Schritt zur der Kombination beider Assay-Prinzipien auf einem Mikroarray wurde durch die Verwendung eines anti-idiotypischen Antikörpers als Ersatz für das niedermolekulare STX erreicht. Der anti-idiotypische Antikörper imitiert die Struktur von STX und wird ebenfalls von dem Detektionsantikörper (anti-STX) erkannt. Die Kalibrierung von STX mit dem anti-idiotypischen Antikörper ergab einen Testmittelpunkt von 13,2 µg/L und eine Nachweisgrenze von 1,4 µg/L. Die Immobilisierung von Fängerantikörpern für Rizin und SEB und dem anti-idiotypischen Antikörper für STX bot den Vorteil, dass eine gleichartige Behandlung bei der Herstellung von Antikörper-Mikroarrays ermöglicht wurde und dabei auf toxische Substanzen verzichtet werden konnte.

Der zweite Schritt bestand in der gleichzeitigen Zugabe von Antikörpern und Antigenen in die Inkubationsschleife des MCR3 und anschließend in den Mikroarray-Chip. Die kurze Vorinkubationszeit ermöglichte die Bindung von Rizin und SEB mit ihren spezifischen Detektionsantikörpern, gefolgt von der Bildung des Sandwich-Formats mit ihren Fängerantikörpern. Gleichzeitig fand im Mikroarray-Chip eine Konkurrenzreaktion für STX mit dem anti-idiotypischen Antikörper um die Detektionsantikörper statt. Zusammengefasst wurde durch die parallele Zugabe von Antikörpern und Analyten nach dem Stopped-Flow-Prinzip die CL-Signalintensität gesteigert und der gleichzeitige Nachweis von Substanzen verschiedener molarer Massen realisiert.

Für die Multiplex-Kalibrierungen ergaben sich Kalibrierdaten, die in einem ähnlichen Bereich wie die Einzel-Kalibrierungen lagen. Dabei wurden Nachweisgrenzen von 2,9 µg/L für Rizin, 0,1 µg/L für SEB und 2,3 µg/L für STX erreicht. Für die Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden zwei Proben mit Rizin, SEB und STX in den Konzentrationen

10 und 100 µg/L jeweils zweimal gemessen, die zu gemittelten Wiederfindungen von 105,9% für Rizin, 102,0% für SEB und 98,5% für STX führten. Insgesamt wurden mit dem Antikörper-Mikroarray sehr gute Wiederfindungsraten mit einer geringen Abweichungen von 100% erhalten. Somit wurde das Ziel, einen Antikörper-Mikroarray für eine schnelle, sensitive und parallele Detektion von Toxinen verschiedener Molekulargewichte zu entwickeln, erreicht.

Die Ergebnisse für die Antikörper-Mikroarrays wurden ausschließlich in Puffer erreicht. In weiterführenden Arbeiten wären Kalibrierungen und Bestimmungen der Wiederfindungsraten in verschiedenen Matrices wie beispielsweise Trinkwasser, Milch, Saft, Blut und Speichel erforderlich. Zudem wären Messungen von Realproben mit Rizin und SEB von großem Interesse, um eine Validierung dieses Detektionssystems zu ermöglichen. Im Falle einer vorsätzlichen Kontamination von Lebensmittel oder Trinkwasser könnte der MCR3 aufgrund seiner Transportfähigkeit direkt vor Ort zur Analyse der Biotoxine eingesetzt werden.

5 Summary and Outlook

Biotoxins that may occur due to natural or deliberate release as contamination of drinking water and food display a permanent risk potential for humans. Examples for natural contamination are phycotoxins, which are produced by various species of algae and accumulate in the tissue of living shellfish. Depending on the external circumstances very high concentrations of phycotoxins can be reached in the shellfish tissue, and contaminated shellfish cannot be distinguished from uncontaminated one by its outer appearance. The consumption of contaminated shellfish leads to severe symptoms of intoxication in humans, which can be lethal in very rare cases. To protect humans from shellfish poisoning, maximum permitted limits for phycotoxins in harvested mussels have been defined by an EU regulation. As a consequence, ASP toxins are limited to 20 mg domoic acid (DA) equivalents per kg shellfish meat, DSP toxins to 160 μg okadaic acid (OA) equivalents per kg shellfish meat and PSP toxins to 800 μg saxitoxin (STX) equivalents per kg shellfish meat.

Within the scope of this work flow-through chemiluminescence (CL) microarrays were developed to monitor continuously the maximum tolerable concentrations for phycotoxins in harvested mussels. These microarrays can be analyzed on the portable microarray readout platform MCR3 (Munich chip reader). In contrast to conventional immunological systems such as ELISA, MCR3 is an automated microfluidic system and allows a fast, sensitive and parallel identification and quantification of different analytes from a single sample. The most important steps for realization of the phycotoxin microarray are outlined below.

To achieve a simultaneous detection of DA, OA and STX, these phycotoxins were directly immobilized on an EpoxyPEG-activated glass surface. The incubation of phycotoxins on EpoxyPEG-activated chip surfaces at 25°C and 55% humidity led to homogeneous, round and sharply defined spots, moreover showing the highest CL signal intensities compared to other procedures. The phycotoxins were spotted in a specific array pattern, containing 3 rows with 5 replicates for each toxin. By comparing the CL signal variances of the multi-coated spots in x- and y-direction on one microarray chip we could guarantee, that neither the spotting process nor the flow direction influenced the CL signal intensities.

The marine biotoxins being small molecules (< 1 kDa) an indirect competitive immunoassay was applied as a test principle. First of all, a measuring program was developed for the practical implementation of this test principle on the flow-through analysis platform MCR3. For this purpose, the flow rates of the addition of primary and secondary antibodies were

varied and different dilution ratios of the primary antibodies were tested. With regard to assay time, CL signal intensities and consumption of antibodies, the flow rate was adjusted to 2 $\mu\text{L/s}$ for primary antibodies at a dilution of 1:4000 (0.25 $\mu\text{g/L}$). For the secondary antibodies a flow rate of 5 $\mu\text{L/s}$ was chosen. Thus, the total assay time of the optimized measuring program including the regeneration step was 20 min.

The regeneration of the microarray chip surface was achieved using a SDS-HCl buffer at pH 3. Within the 25 regeneration cycles, a linear decrease of the CL signal was observed for DA and OA. On the contrary, the CL signal decrease for STX was exponential. After performing 25 regeneration cycles the normalized CL signal decreases were calculated to $48.0 \pm 5.6\%$ for DA, $76.0 \pm 2.1\%$ for OA and $23.3 \pm 1.0\%$ for STX. Due to these CL signal decreases a defined measuring strategy for each microarray chip was established to investigate the effects of the direct immobilization strategy including regeneration on the internal calibrations as well as on the recovery rates. For this purpose single- ($n = 7$, $m = 1$) and multi-analyte calibrations ($n = 7$, $m = 3$) of marine biotoxins were generated in buffer with detection limits of $1.2 \pm 0.6 \mu\text{g/L}$ for DA, $1.3 \pm 0.5 \mu\text{g/L}$ for OA and $1.0 \pm 0.2 \mu\text{g/L}$ for STX. Based on the low variation coefficient (CV) of $< 10\%$, the high reproducibility of phycotoxin calibrations on different microarray chips and on different days was demonstrated. The variation coefficients were calculated using the midpoints of the multi-analyte calibrations.

Without introducing any mathematical corrections for the CL signal loss, the recovery rates of all spiked samples resulted in an overestimation of more than 200%. For the correction of the CL signals two correction methods were introduced. Applying the correction method I the CL signal decrease was corrected using the blank measurements introduced in the defined measuring strategy. This resulted in recovery rates of 86.2% for DA, 102.5% for OA and 61.6% for STX in buffer. Overall, the correction method I led to reliable recoveries close to 100% for DA and OA, which allowed an accurate and parallel quantification of these phycotoxins in spiked samples. In contrast, the nonlinear CL signal decrease for STX provided only an underestimation of the samples. Also, for the correction method II, good recovery rates for OA and DA were reached. Correction method II was based on the application of correction factors, which were calculated from the blank measurements. Here the determination of STX resulted in an overestimation of the samples. Both correction methods need to be improved in further studies to allow accurate quantitation of STX. To determine the recovery rates of shellfish samples correction method I was used.

Before analyzing contaminated shellfish samples, a mixture of methanol and water (1/1) was identified as the optimal extraction buffer for all tested phycotoxins. The shellfish samples were prepared by adding 5 mL extraction buffer to 1 g shellfish homogenate. The extract was then diluted with the amount of PBS necessary to quantify the shellfish samples at the maximum permitted limits of each phycotoxin. Therefore, the determined dilution factors were 1/667 DA, 1/9 for OA and 1/50 for STX. According to these dilution factors, calibrations of each phycotoxin were carried out in shellfish matrix. Compared to the detection limits in buffer, similar LODs of $0.5 \pm 0.3 \mu\text{g/L}$ for DA, $1.0 \pm 0.6 \mu\text{g/L}$ for OA and $0.4 \pm 0.2 \mu\text{g/L}$ for STX were achieved. Thus, calibration and qualification can be performed in a multiplexed way for the detection of phycotoxins in shellfish samples. However, to enable an accurate quantitative analysis of spiked and contaminated shellfish samples the utilization of the required dilution factors for each phycotoxins was needed. The recovery rates obtained for spiked shellfish samples were 82.3% for DA, 146.8% for OA and 61.2% for STX, which are comparable to the recovery rates in buffer. The generated working ranges for each phycotoxin included the maximum permitted limits. Consequently, an exceedance of these limits can be determined with the help of the phycotoxin-microarray. Due to existing toxin analogues in contaminated shellfish samples only screening for the three phycotoxins was possible.

The advantage of the established phycotoxin-microarray on the multiplex analysis platform MCR3 was the simultaneous detection of different phycotoxins in buffer (PBS), thereby saving measuring times and costs. Furthermore, the MCR3 is applicable to on-site analysis. In addition, the phycotoxin microarray can be easily extended just by direct immobilization of further phycotoxins on the chip surface. Thus, in continuing works the extension of the phycotoxin microarray to other toxin families is desirable. Moreover, it would be of high interest to analyze more contaminated shellfish samples with different toxin profiles. If all analogues are available sufficiently, the determination of existing cross-reactivities of all antibodies could be performed. Finally, the determination of the decision limit $CC\alpha$ and the detection limit $CC\beta$ would be necessary for the validation of this method as a screening tool for phycotoxins according to the regulation 2002/657/EC.

A further aim of this work was the development of an antibody-based multiplex-detection system for biotoxins, which can be useful in case of a deliberate contamination of food, water or air. For this purpose, the analytes studied were high molecular weight proteotoxins such as

the plant toxin ricin (60 kDa) and the bacterial toxin staphylococcal enterotoxin B (SEB, 30 kDa), as well as the phycotoxin saxitoxin (STX, 0.3 kDa), which is produced by marine microalgae (dinoflagellates).

The difficulty in developing a sandwich immunoassay for the detection of ricin was to generate sufficiently high CL signal intensities during measurements. Therefore, different factors which are able to influence the CL signal intensities were examined first in stationary systems and then transferred to the flow-through microarray platform MCR3. The amplification of the CL signal was mainly reached using both SA-PolyHRP40 and ricin (instead of the surrogate agglutinin). In addition, the binding of ricin to the detection antibody was identified as the most time-consuming step in the assay. In contrast to a sequential addition, the parallel addition of analytes and detection antibodies into the incubation loop of the MCR3 as well as into the microarray chips led to a significant increase of the CL signal intensities. In contrast to a continuous addition of the mixture of analytes and antibodies, the CL signals could be further raised by the stopped-flow addition of this mixture. For the optimized measuring program, the analyte-antibody-mixture was pumped into the microarray chip with a flow rate of 10 $\mu\text{L/s}$ in 50- μL units. The optimal interaction time per volume element was determined as 10 s. The total assay time of the optimized measuring program was thus 18 min. In contrast to the phycotoxin microarray, a new antibody microarray was needed for each measurement of proteotoxins as ricin, as a regeneration of the immobilized capture antibodies was not possible without major CL signal losses. The reproducibility of the measurements was ensured by measuring one concentration of ricin on several microarrays of one batch, which resulted in low deviations ($< 7,5\%$) of the CL signal intensities. By using the capture antibody R109/3 and the detection antibody R18/1/1-bio, the most sensitive calibration curve was obtained with a midpoint of 224.1 $\mu\text{g/L}$ and a detection limit of 5.0 $\mu\text{g/L}$.

The measuring program optimized for ricin was also applied for the detection of SEB. Three monoclonal antibodies were available for this purpose, which were tested in each case as capture and detection antibody. The most sensitive calibration curve for SEB with a midpoint of 28.8 $\mu\text{g/L}$ and a detection limit of 0.1 $\mu\text{g/L}$ resulted using the capture antibody S1001/4/6 and the detection antibody S419/5/5/5-bio.

The parallel detection of analytes such as ricin, SEB and STX posed a major challenge, as biotoxins with a molecular mass below 1 kDa are analyzed by an indirect competitive immunoassay. However, analytes which have a greater molecular mass are identified using a

sandwich immunoassay. The first step towards the combination of both assay principles on one microarray chip was achieved by the use of an anti-idiotypic antibody as a substitute for the low molecular weight molecule STX. The anti-idiotypic antibody mimics the structure of STX and is also recognized by the detection antibody (anti-STX). The calibration of STX with the anti-idiotypic antibody resulted in a midpoint of 13.2 $\mu\text{g/L}$ and a detection limit of 1.4 $\mu\text{g/L}$. The immobilization of capture antibodies for ricin and SEB and the anti-idiotypic antibody for STX on one microarray offered the advantage of applying the same conditions for the preparation of antibody microarrays and therefore the handling of toxic substances in this process can be avoided.

The second step included the simultaneous addition of all analytes and antibodies into the incubation loop of the MCR3 and then into the microarray chip. The short pre-incubation time allowed binding of ricin and SEB to their specific detection antibodies, followed by the formation of a sandwich format with their specific capture antibodies. Simultaneously, a competitive reaction of STX with the anti-idiotypic antibodies for the specific detection antibodies took place on the microarray chip. In summary, CL signal intensities were enhanced by the parallel addition of analytes and antibodies according to the stopped-flow principle and the parallel analysis of substances with highly different molar masses was realized.

The calibration data obtained for the multi-analyte calibrations were in the same range as the single-analyte calibrations. The limits of detection reached were 2.9 $\mu\text{g/L}$ for ricin, 0.1 $\mu\text{g/L}$ for SEB und 2.3 $\mu\text{g/L}$ for STX. For the determination of the recovery rates, two samples with ricin, SEB and STX having the concentrations 10 and 100 $\mu\text{g/L}$ were each measured twice, leading to averaged recoveries of 105.9% for ricin, 102.0% for SEB and 98.5% for STX. Overall, very good recoveries with low deviations from 100% recovery were obtained by employing this antibody microarray. Thus, the aim to develop an antibody microarray for a rapid, sensitive and simultaneous detection of toxins of various molar masses was reached.

As a proof-of-principle, all results of these antibody microarrays were reached solely in buffer. For continuing works, the calibration and determination of recovery rates in various matrices such as drinking water, milk, juice, blood and saliva is required. In addition, measurements of real samples containing ricin and SEB are of high interest for the final validation of this antibody microarray based detection system. In the case of a deliberate contamination of food or drinking water the MCR3 could be used for on-site analysis of biotoxins, because of its portability.

6 Experimententeil

6.1 Verwendete Materialien

6.1.1 Geräte und Zubehör

ELISA

- ELISA-Auslesegerät Synergy HT (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland)
- Schüttler für Mikrotiterplatten, Easyshaker EAS 2/4 (SLT Labinstrumente Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland)
- Waschautomat ELx 405 Select (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland)

Mikroarray

- Doppelseitige Klebefolie (ARcare 90106, Adhesive Research Ireland, Limerick, Irland)
- Klebefolie mit gestanzten Flusskanälen (Karl Marbach GmbH & Co. KG, Heilbronn, Deutschland)
- Munich Chip Reader, MCR3 (GWK Präzisionstechnik, München, Deutschland)
- Schwarzer Poly(methylmethacrylat)-Träger (Institut für Wasserchemie, München, Deutschland)
- Spotter, BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Spotternadel Stealth Solid Pin SNS 9 (ArrayIt, Sunnyvale, USA)

Sonstige Geräte

Autoklav (SHP Steriltechnik AG, Magdeburg, Deutschland)

Graviergerät mit Diamantstift (Proxxon, Niersbach, Deutschland)

Laborwaage AT 261 Delta Range (Mettler, Giessen, Deutschland)

Millipore Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185 (Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland)

NanoPhotometer (Implen GmbH, München, Deutschland)

pH-/mV-/Temperatur-Messgerät SevenGo™ SG2 (Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland)

Trockenschrank (Memmert, Büchenbach, Deutschland)

Vortexer (REAX top, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland)

Ultraschallbad Sonorex RK510S (Bandelin, Berlin, Deutschland)

Zentrifuge Universal 320R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)

6.1.2 Software

Avis FITS Viewer (MSB di F. Cavicchio, Ravenna, Italien)

BioOdyssey Calligrapher 2.0 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)

ChemBioOffice 2010 (CambridgeSoft, Cambridge, USA)

Corel Graphics Suite 11 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada)

Gen5 (BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland)

LabView 8.2 (National Instruments, Austin, USA)

MCRImageAnalyzer V.0.3.2.1 (Odevis AG, Burghausen, Deutschland)

Microsoft Office 2011 (Microsoft, Redmond, USA)

Origin 7G (OriginLab Corporation., Northampton, USA)

6.1.3 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen 1 mL (T987.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Glasobjektträger 76mm (\pm 0.1mm) \times 26mm \times 1mm (BA11.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Mikrotiterplatten, 96 Kavitäten, hohe Bindungskapazität (655061, Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

Mikrotiterplatten, 384 Kavitäten, niedrige Bindungskapazität (784201, Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

Parafilm (H666.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Reaktionsgefäße 1.5 mL (4190.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Rollrandgläser, 5 mL (X654.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Rollrandgläser, 10 mL (X655.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Slide-A-Lyzer MINI Dialyse Unit, MWCO: 2 kDa (69580, Thermo Scientific, Bonn, Deutschland)

Verschlussfilm für Mikrotiterplatten (EN76.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Zentrifugenröhrchen PP, 15 mL, unsteril (AN76.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Zentrifugenfilter, 0,5 mL, MWCO: 30kDa (UFC503024, Millipore, Massachusetts, USA)

Chemikalien

Cysteamin (30070, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Diaminopolyethylenglykol (DAPEG), 2000 Da (XTJ502, Huntsman, Rotterdam, Niederlande)

Di-Kaliumhydrogenphosphat, Reinheit: $\geq 99,0\%$, puriss. (04248, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

4-Dimethylaminopyridin (DMAP), Reinheit: puriss. (29224, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Dimethylformamid (DMF), Reinheit: $\geq 99,8\%$, absolut (40248, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Di-Natriumhydrogenphosphat, Reinheit: $>99,0\%$, wasserfrei, puriss. p.a. (71640, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

N-(2,4)-Dinitrophenylethylendiamin (15083, ChemPur Feinchemikalien, Karlsruhe, Deutschland)

Di(*N*-succinimidyl)carbonat (DSC), Reinheit: $\geq 95,0\%$, purum (43720, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Ethanol absolut, Reinheit: $\geq 99,8\%$ (32205, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Ethylendiamin (E1521, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (10538723, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)

Glutaraldehyd (G6257, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Glycerin (G5516, Sigma, Steinheim, Deutschland)

Glycin (33226, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (GOPTS), Reinheit: $\geq 97,0\%$, purum (50040, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Hellmanex (320.000, Hellma GmbH, Müllheim, Deutschland)

Kaliumhydrogenphosphat, Reinheit: $\geq 99,0\%$, wasserfrei, purum p.a. (60230, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Kasein (C5890, Sigma, Steinheim, Deutschland)

Methanol, Reinheit: $\geq 99,8\%$, für HPLC (65548, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Mucosol (60434, Merz Hygiene GmbH, Frankfurt, Deutschland)

Natriumcarbonat (73151, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Natriumchlorid, Reinheit: $\geq 99,5\%$, purum p.a. (71381, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Natriumdihydrogenphosphat, Reinheit: $> 99,0\%$, wasserfrei, purum p.a. (71496, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Natriumdodecylsulfat (SDS, L6026, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Natriumhydroxid-Plättchen (S5881, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Paraformaldehyd (818715, Merck, Darmstadt, Deutschland)

Pluronic F127 (P2443, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Polyethylenglykoldiglycidylether (EpoxyPEG), 526 Da (475696, Sigma, Steinheim, Deutschland)

Salzsäure rauchend, 37%, puriss. p.a. (84422, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Schwefelsäure, 95 – 97%, puriss. p.a. (84720, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), Reinheit: $\geq 98\%$ (87748, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Trehalose-D(+) Dihydrat, Reinheit: $\geq 99,5\%$ (90208, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Triethylamin (NEt_3), Reinheit: $\geq 99,5\%$, puriss. p.a. (90340, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Trishydroxymethylaminomethan (T1378, Sigma, Steinheim, Deutschland)

Tween20 (63185, Riedel-de Haën, Hounslow, UK)

Wasserstoffperoxid, 30 Gew.%, stabilisiert, Reinheit: puriss. p.a. (31642, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

WESTAR SUPERNOVA ELISA Luminol solution (XLSE2L, Cyanagen, Bologna, Italien)

WESTAR SUPERNOVA ELISA Peroxide solution (XLSE2P, Cyanagen, Bologna, Italien)

6.1.4 Antigene, Antikörper, Enzyme, Konjugate und Toxine

Agglutinin, RCA120, 0,2 g/L (Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland)

Anti-Domainsäure aus Maus, mAk, 1,0 g/L (Institute of Agri-Food and Land Use, Belfast, Irland)

Anti-HRP aus Hase, pAk (P7899, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Anti-Huhn IgY (H+L) aus Hase, pAk, HRP markiert, 1,5 g/L (ab6753, Abcam plc, Cambridge, UK)

Anti-idiotypischer Antikörper aus Maus, mAk 1F8, 0,5 g/L (Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU München, Deutschland)

Anti-Maus IgG (H+L) aus Pferd, pAk, HRP markiert, 1 g/L (VC-PI-2000, Axxora Deutschland GmbH, Lörrach)

Anti-Okadasäure aus Maus, mAk, 1,0 g/L (Institute of Agri-Food and Land Use, Belfast, Irland)

Anti-Rizin R109/3 aus Maus, mAk, 2,0 g/L (Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland)

Anti-Rizin R18/1 aus Maus, mAk, 6,9 g/L (Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland)

Anti-Rizin R18/1-bio aus Maus, mAk, Verdünnung 1:640 (Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland)

Anti-Rizin R18/1/1 aus Maus, mAk, 1,6 g/L (Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland)

Anti-Rizin R21/5/5 aus Maus, mAk, 2,6 g/L (Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland)

Anti-Rizin RH21 aus Huhn, pAk, 69,2 g/L (Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland)

Anti-SEB S1001/4/6 aus Maus, mAk, 1,3 g/L (Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland)

Anti-SEB S3849/4/4/4 aus Maus, mAk, 1,7 g/L (Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland)

Anti-SEB S419/5/5/5 aus Maus, mAk 1,4 g/L (Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland)

Anti-STX aus Maus, mAk 1,0 g/L (Institute of Agri-Food and Land Use, Belfast, Irland)

Anti-STX aus Maus, mAk 7H11, 0,7 g/L (Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU München, Deutschland)

Anti-STX aus Maus, mAk 7H11, Biotin markiert, 0,7 g/L (Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU München, Deutschland)

Anti-TNT, mAk A1, 10,9 g/L (D1930M000-AM, Strategic Diagnostics Inc., Newark, USA)

Belastete und unbelastete Muschelfleisch-Proben (Institute of Agri-Food and Land Use, Belfast, Irland)

Domoinsäure, 1,0 g/L (Institute of Agri-Food and Land Use, Belfast, Irland)

Meerrettich-Peroxidase (HRP, *Horseradish peroxidase*), (10814393001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

Okadasäure, 1,0 g/L (Institute of Agri-Food and Land Use, Belfast, Irland)

Saxitoxin, 0,1 g/L (Institute of Agri-Food and Land Use, Belfast, Irland)

Saxitoxin-Analoga (Institute of Agri-Food and Land Use, Belfast, Irland):

C1/C2 (70,8 µg/L)

dcNEO (10,1 µg/L)

dcGTX 2/3 (51,4 µg/L)

dcSTX (20,4 µg/L)

GTX 1/4 (58,0 µg/L)

GTX 2/3 (62,1 µg/L)

GTX 5 (24,7 µg/L)

NEO (25,2 µg/L)

Staphylococcus Enterotoxin B (SEB), 1,2 g/L (DiaVita GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Streptavidin, HRP markiert 1 g/L (VC-SA-5004, Axxora GmbH, Lörrach, Deutschland)

Streptavidin, Poly-HRP40 markiert, 1 g/L (Senova GmbH, Jena, Deutschland)

Rizin, RCA60, 1,4 g/L (Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland)

6.2 Pufferlösungen

Für die Herstellung aller Pufferlösungen wurde UV-vorbehandeltes destilliertes Wasser verwendet.

Blockpuffer pH 8,5

TRIS (1 M), 121,1 g

37% (v/v) HCl

Wasser, ad 1000 mL

Carbonatpuffer

Na₂CO₃ (15 mM), 1,59 g

NaHCO₃ (35 mM), 2,93 g

NaN₃ (3 mM), 0,2 g

Wasser, ad 1000 mL

Laufpuffer (Kasein)

0,5% (w/v) Kasein, 5,0 g

PBS-Puffer, ad 1000 mL (100°C, 20 min)

Laufpuffer (PBST)

0,05% (v/v) Tween20

PBS-Puffer, ad 1000 mL

PBS-Puffer

KH₂PO₄ (10 mM), 1,36 g

K₂HPO₄ (70 mM), 12,2 g

NaCl (145 mM), 8,5 g

Wasser, ad 1000 mL

Regenerationspuffer

Glycin-SDS-HCl pH 3

Glycin (100 mM), 7,51 g

NaCl (100 mM), 5,85 g

0,1% (w/v) SDS, 0,1 g

37% (v/v) HCl
Wasser, ad 1000 mL

SDS-HCl pH 3

1,0% (w/v) SDS, 1,0 g
37% (v/v) HCl
Wasser, ad 1000 mL

Acetonitril-NaOH

NaOH (180 mM), 6,12 g
15% (v/v) Acetonitril, 150 mL
Wasser, ad 1000 mL

Glycin-Tween-HCl pH 3

Glycin (100 mM), 7,51 g
NaCl (100 mM), 5,85 g
Tween20 (v/v), 1 mL
37% (v/v) HCl
Wasser, ad 1000 mL

Spottingpuffer

Pluronic F127, 0,05 mg
Trehalose-D(+) Dihydrat, 100 mg
PBS-Puffer, ad 1 mL

Waschpuffer

4% (v/v) Mucosol, 28,6 mL
Wasser, ad 1000 mL

6.3 Herstellung von Antigen- und Antikörpermikroarrays

Im Folgenden wird die gesamte Herstellung von Antigen- und Antikörpermikroarrays über die Beschichtung und Aktivierung von Glasobjektträgern, Immobilisierung von Antigenen

und Antikörpern, Blocken der Mikroarrays bis hin zur Fertigung eines Mikroarray-Chips beschrieben.

6.3.1 Beschichtung der Glasobjektträger

Für die Herstellung von Antigen- bzw. Antikörper-Mikroarrays wurden kommerziell erhältliche Glasobjektträger (26 mm x 76 mm) verwendet. Zur Unterscheidung der beiden Glasobjektträgerseiten wurde mit einem Diamantstift auf einer Seite eine fortlaufende Nummer (1 - 20) eingraviert, wobei die Markierung die unbeschichtete Seite kennzeichnete.

6.3.1.1 Herstellung von Polyethylenglykol-Oberflächen

Reinigung

Um Verunreinigungen zu entfernen, wurden die Glasobjektträger in eine Färbeschale mit einer 2%igen Hellmanex-Lösung (200 mL) für 1 h ins Ultraschallbad getaucht. Danach wurden die Glasobjektträger für 15 h auf den Schüttler und dann erneut für 1 h ins Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurden die Chips mit destilliertem Wasser in 5 x 200 mL Portionen gründlich gespült. Die Anätzung der Glasoberfläche der Objektträger erfolgte in einer Lösung aus 37% HCl und Methanol (1:1, 200 mL) für 1 h auf den Schüttler. Nach weiteren Waschschritten (5 x 200 mL, dest. Wasser) folgte ein einstündiges Schütteln der Chips in 200 mL konzentrierter Schwefelsäure. Die Glasobjektträger wurden nochmals mit Wasser (5 x 200 mL) gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und visuell kontrolliert.

Silanisierung

Die Silanisierung der Glasobjektträger fand in einem Sandwich-Format statt, wobei auf die unmarkierte bzw. säureaktivierte Oberfläche eines Chips 600 µL GOPTS pipettiert wurden und ein weiterer Chip mit der unmarkierten Seite (nach unten) darauf gelegt wurde. Die so gebildeten Sandwichs wurden für 1 h in geschlossenen Petrischalen bei Raumtemperatur gelagert. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Sandwichs in absoluten Ethanol voneinander getrennt und in den Trägereinsatz einer Färbeschale einsortiert. Daraufhin wurden die Chips mit Ethanol, Methanol und Ethanol jeweils für 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Die Trocknung der Chips erfolgte im Stickstoffstrom.

Belegung mit DAPEG

Die Belegung mit DAPEG erfolgte wie zuvor schon die Silanisierung mittels Sandwich-Technik. Dazu wurden 600 µL geschmolzenes DAPEG auf die silanisierte Seite des Glasobjektträgers verteilt und darauf ein weiterer Chip gelegt. In geschlossenen Petrischalen

wurden die Sandwichs über Nacht in einen Trockenschrank bei 98°C gestellt. Die Glasschips wurden in einem Wasserbad voneinander getrennt, in Färbeschalen für 15 min in ein Ultraschallbad gestellt und anschließend mit Wasser gewaschen (5 x 200 mL). Die Trocknung erfolgte wiederum im Stickstoffstrom. Bis zur Aktivierung (Kapitel 6.3.2) wurden die beschichteten Glasobjektträger im Exsikkator bei Raumtemperatur gelagert.

6.3.1.2 Herstellung von Poly-L-Lysin-Oberflächen

Nachdem die gravierten Glasobjektträger unter Schütteln in 2,5 M Natronlauge für 2 h angeätzt wurden, wurden diese mit Wasser (5 x 200 mL) gewaschen und im N₂-Strom getrocknet. Anschließend wurden je 2 Chips im oben beschriebenen Sandwich-Format mit 500 µL einer 3% Poly-L-Lysin-Lösung in PBS für 1 h bei Raumtemperatur beschichtet. Nach einem weiteren Waschschriff mit Wasser (5 x 200 mL) wurden die Chips im N₂-Strom getrocknet und für 1 h bei 80 °C im Trockenschrank gestellt. Bis zur Immobilisierung der biologischen Komponenten über das Kontaktpotting-Verfahren (Kapitel 6.3.3) wurden die Mikroarray bei 4°C gelagert.

6.3.1.3 Herstellung von Dendrimer-Oberflächen

Reinigung

Das Anätzen der Glasoberflächen erfolgte nach demselben Verfahren, welches für die Polyethylenglykol-Oberflächen beschrieben wurde (Kapitel 6.3.1.1).

Silanisierung

600 µL GOPTS wurden auf einen Glasobjektträger gegeben, mit einem zweiten im Sandwich-Format verschlossen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die silanisierten Glasobjektträger für 15 min im Ultraschallbad in Ethanol (200 mL) gereinigt und im N₂-Strom getrocknet.

Belegung mit Dendrimeren

600 µL einer 0,1% PAMAM Dendrimer-Lösung in Methanol wurden auf einen Glasobjektträger gegeben, mit einem zweiten zu einem Sandwich-Format verschlossen und 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die beschichteten Glasobjektträger wurden für 15 min in Ethanol und 5 min in Wasser (jeweils 200 mL) im Ultraschallbad gereinigt und im N₂-Strom getrocknet. Anschließend wurden die Glasobjektträger 3 h im Sandwich-Format mit 600 µL 10 mM Bernsteinsäureanhydrid in DMF inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit Ethanol (200 mL) für 15 min im Ultraschallbad und Trocknung im N₂-Strom wurden die

Chips mit 10 mM NHS/EDC (1:1, v/v) in DMF 1 h bei Raumtemperatur aktiviert. Vor dem Einsatz im Dendrimer-beschichteten Chips im Kontaktpotting-Verfahren (Kapitel 6.3.3) wurden diese 15 min im Ultraschallbad mit Ethanol (200 mL) gereinigt und im N₂-Strom getrocknet.

6.3.1.4 Herstellung der Aminodextran-Oberflächen

Reinigung und Silanisierung

Das Anätzen der Glasoberflächen und die Silanisierung erfolgten nach demselben Verfahren, welches für die Polyethylenglykol-Oberflächen beschrieben wurde (Kapitel 6.3.1.1).

Belegung mit Aminodextran

249,8 mg Aminodextran wurden in 500 µL destillierten Wasser gelöst und auf die silanisierten Glasobjektträger gegeben, mit einem zweiten zu einem Sandwich-Format verschlossen und 12 h inkubiert. Anschließend wurden die Chips mit Wasser (5 x 200 mL) im Ultraschallbad gereinigt, im N₂-Strom getrocknet und bis zur Immobilisierung der biologischen Komponenten über das Kontaktpotting-Verfahren (Kapitel 6.3.3) im Exsikkator bei Raumtemperatur gelagert.

6.3.2 Aktivierung

6.3.2.1 DiepoxyPEG-Aktivierung für Antigen-Mikroarrays

Die mit DAPEG beschichteten Glaschips wurden mit 600 µL Diepoxy-PEG belegt und im Sandwich-Format in geschlossenen Petrischalen für 15 h bei 98°C im Trockenschrank inkubiert. Die Chips wurden in Methanol voneinander getrennt und zweimal jeweils für 15 min in Methanol im Ultraschallbad unter Austausch des Methanols gereinigt. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom konnten die Chips direkt für den Spottingvorgang verwendet werden.

6.3.2.2 NHS-Aktivierung für Antikörper-Mikroarrays

Die freien Aminogruppen der DAPEG-beschichteten Glaschips wurden weiter modifiziert, indem 600 µL einer Lösung aus 360 mg DSC, 20 mg DMAP, 5,7 mL DMF und 451 µL NEt₃ auf die Chips pipettiert werden. Die Inkubationszeit für die Chips im Sandwich-Format betrug 4 h bei Raumtemperatur. Anschließend werden die Glasschips in Methanol voneinander getrennt und zweimal jeweils für 5 min in Methanol im Ultraschallbad unter Austausch des

Methanols gereinigt. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom konnten die Chips direkt für den Spottingvorgang verwendet werden.

6.3.3 Immobilisierung

6.3.3.1 Kontaktpotter

Zur Immobilisierung der verschiedenen Analyte auf den aktivierten Glaschip-Oberflächen wurde der Kontaktpotter BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer von Bio-Rad Laboratories GmbH verwendet (Abbildung 6.1).



Abbildung 6.1: BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer.

Bis zu neun Mikroarrays können in einem Spottingvorgang gefertigt werden. Die zu spottenden Analyte wurden in den jeweiligen Spottingpuffern gelöst und jeweils 20 - 25 μL in eine 384-well Mikrotiterplatte pipettiert. Das Aufbringen der Analyt-Lösungen erfolgte mit einer Spottingnadel, einem Solid Pin SNS 9 mit einem Übertragungsvolumen von ca. 3 nL. Um eine Austrocknung der aufgetragenen Analyte (Spots) zu verhindern, wurde die Luftfeuchtigkeit im Kontaktpotter auf 50% bei einer Temperatur von 15°C eingestellt. Ein fertiger Mikroarray-Chip besitzt zwei voneinander getrennte Flusszellen, die sich einem Abstand von 11,75 mm befinden. Auf jeder Flusszelle wurden die Analyte untereinander in einer Reihe mit einem Abstand von 1,1 mm (y-Richtung) zu je 5 Wiederholungen aufgebracht. Der Abstand der Reihen zueinander beträgt 1,3 mm (x-Richtung).

6.3.3.2 Antigene - Phycotoxine

Für die Positivkontrolle wurde eine 0,1 g/L DNPEDA-Lösung in DMSO-Carbonatpuffer (1:1) verwendet. Destilliertes Wasser stellte bei den Antigen-Mikroarrays die Negativkontrolle dar.

Die verwendeten Konzentrationen und Spottingpuffer für die verschiedenen Phycotoxine sind in der **Tabelle 6.1** zusammengefasst.

Tabelle 6.1: Verwendete Konzentrationen und Spottingpuffer für Phycotoxine.

Antigen	Konzentration [g/L]	Spottingpuffer
DNPEDA	0,1	DMSO-Carbonatpuffer (1:1)
DA	1,0	Destilliertes Wasser
OA	1,0	DMSO
STX	0,1	0,003M HCl in 20% Ethanol / Wasser, pH 3,5

Für die Untersuchung der kovalenten Kopplungsstrategien wurde Saxitoxin in einer Konzentration von 10 mg/L eingesetzt. Die verwendeten Spottingpuffer-Zusätze waren Paraformaldehyd (1,3 μ M, 0,04 μ g), Glutaraldehyd (1,3 μ M, 0,1 μ g), Ethylendiamin (1,3 μ M, 0,08 μ g) und Cysteamin (1,3 μ M, 0,1 μ g).

Nach dem Spotten wurden die Phycotoxin-Mikroarrays für 15 h im Klimaschrank bei 25°C und bei einer Luftfeuchtigkeit von 55 % inkubiert.

6.3.3.3 Antikörper

Als Positivkontrolle wurde eine 1,0 g/L Lösung (0,005 % Pluronic, 10 % Trehalose) aus anti-HRP hergestellt. Die Lösung aus 0,005 % Pluronic und 10 % Trehalose stellte zudem die Negativkontrolle dar. Die verwendeten Konzentrationen und Spottingpuffer für die verschiedenen Fängerantikörper sind in der **Tabelle 6.2** zusammengefasst.

Tabelle 6.2: Verwendete Konzentrationen und Spottingpuffer für Fängerantikörper.

Antikörper	Konzentration [g/L]	Spottingpuffer
Anti-HRP	1,0	0,005 % Pluronic, 10 % Trehalose
Anti-Rizin (R109/3)	1,0	
Anti-Rizin (R21/5/5)	1,0	0,005 % Pluronic, 10 % Trehalose
Anti-Rizin (RH21)	1,0	
Anti-SEB (S1001/4/6)	1,0	
Anti-SEB (S3849/4/4/4)	1,0	0,005 % Pluronic, 10 % Trehalose
Anti-SEB (S419/5/5/5)	1,0	
Anti-idiotypischer Antikörper (mAk 1F8)	0,5	0,09% NaN ₃ in PBS

Nach dem Spotten fand die Inkubation der Antikörper-Mikroarrays über Nacht (15 h) bei 4°C statt.

6.3.4 Blocken

Um nicht gebundene Antikörper bzw. Antigene zu entfernen sowie um unspezifische Bindungen an den noch freien Bindungsstellen der aktivierten Glasoberfläche zu verhindern, wurden alle Mikroarrays für 15 min mit einem Blockadepuffer aus TRIS-HCl im Ultraschallbad geblockt. Anschließend wurden die inaktivierten Mikroarrays in Färbeschalen für 5 min in destilliertem Wasser sowie für 5 min in Methanol ins Ultraschallbad gestellt und im Stickstoffstrom getrocknet.

6.3.5 Fertigung der Mikroarray-Durchflusszellen

Ein fertiger Mikroarray-Chip besteht aus drei Teilen, die zuvor zusammengefügt wurden (Abbildung 6.2). Zum einen wurde ein schwarzer Kunststoffträger (PMMA) benötigt, der Einfräsungen für den Zu- und Ablauf der Lösungen besitzt. Zum anderen wurde ein mit Antikörpern bzw. Antigenen beschichteter und inaktivierter Mikroarray benötigt. Um die beiden Teile miteinander zu verbinden, wurde eine doppelseitige Klebefolie mit Ausschnitten für die beiden Flusszellen verwendet. Die Fertigung des dreiteilig, verkapselten Mikroarray-Chips mit den beiden Flusszellen wurde durch eine spezielle Vorrichtung ermöglicht, die am Institut entwickelt und konstruiert wurde. Anschließend wurden die fertigen Mikroarray-Chips in die dafür vorgesehene Schublade am MCR3 eingelegt.

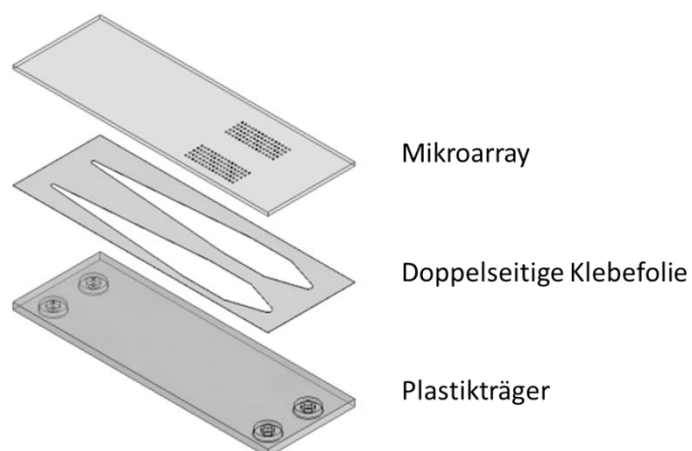


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung der Fertigung eines Mikroarray-Chips.

6.4 Messungen am Munich Chip Reader (MCR3)

6.4.1 Aufbau des MCR3

Beim MCR3 (Abbildung 6.3) handelt es sich um ein computergesteuertes Durchfluss-Chemilumineszenz-Auslesesystem für Mikroarray-Chips.

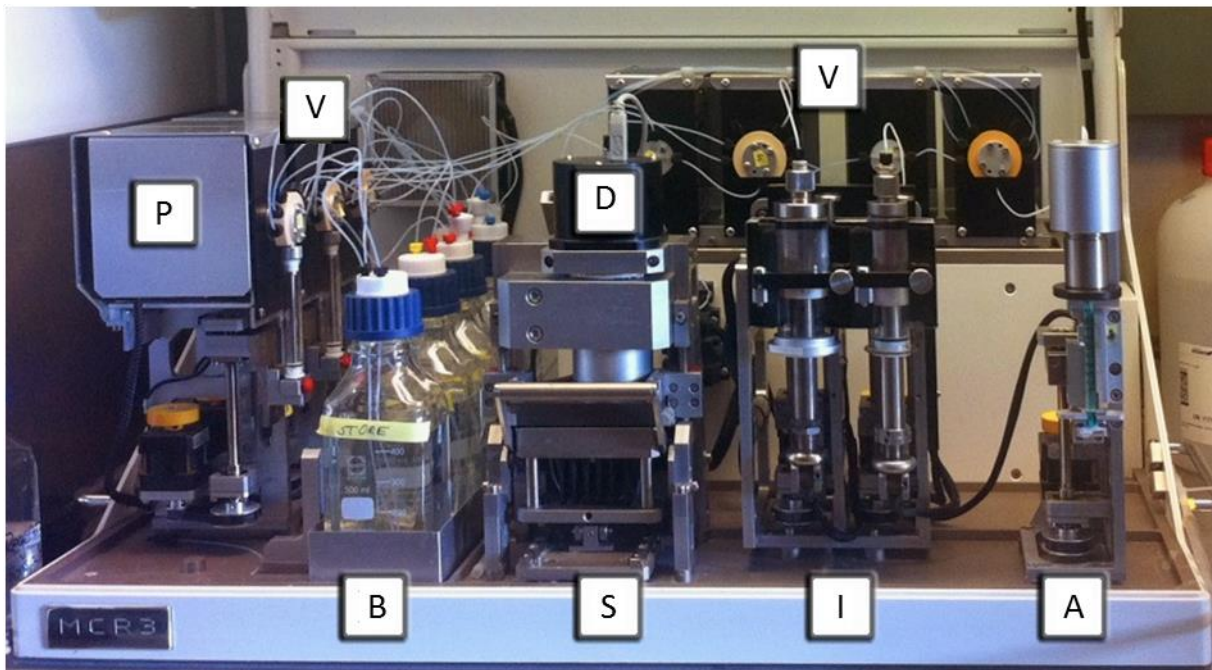


Abbildung 6.3: Aufbau des MCR3: Probenspritze (A), Spritzeinheiten (I) für Immunoassay-reagenzien (Antikörper, Konjugate), Schubladenvorrichtung (S) für Mikroarray-Chips, Detektionseinheit (D), Vorratsgefäße für Puffer (B), Pumpeneinheit (P) und Ventileinheit (V).

Für die Analyse von Analyten werden die gefertigten Mikroarray-Chips in die vorgesehene Schublade (S) eingelegt. Diese Schublade wird dann mechanisch mit der Detektionseinheit (D) verbunden, wodurch eine abgedunkelte und lichtundurchlässige Kammer gebildet wird. In der Detektionseinheit ist oberhalb des Mikroarray-Chips die CCD-Kamera angebracht. Diese besitzt eine Quantenausbeute von 65% bei 420 nm. Man erhält Bilddateien, die eine Auflösung von 696×520 Pixel besitzen. Maximal kann ein Signal von 65.535 a.u. pro Pixel gemessen werden.

An der Rückwand und auf der linken Seite des MCR3 befinden sich die Ventileinheiten (V), die die Flüsse der Reagenzien und Puffer, zusammen mit den Pumpeneinheiten (P) auf der linken Seite im MCR3, regeln. Dabei sind die Pumpen P4 und P5 mit 5 mL Glasspritzen und die Pumpe P3 mit einer 1 mL Glasspritze ausgestattet. Je nach Anforderung können die Pumpen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten betrieben werden.

Die zur Messung benötigten Puffer und Reagenzien befinden sich in den Vorratsgefäßen (B), in den Spritzeneinheiten (I) und in der Probenspritze (A). Die Spritzeneinheit besteht dabei aus einer kleineren Glasspritze mit einem Volumen von 25 mL für Primärantikörper und einer größeren mit einem Volumen von 50 mL für Sekundärantikörper oder Konjugate. Die einzige manuelle Komponente ist die 1 mL Probenspritze, die nach jedem Messvorgang neu befüllt werden muss.

Über Schläuche, Ventile und Pumpen werden die Mikroarray-Chips mit den benötigten Reagenzien versorgt. Um besonders effektiv arbeiten zu können, besitzt jeder Mikroarray-Chip zwei Flusszellen. Während auf einer Flusszelle gemessen wird, kann die zweite für weitere Messungen regeneriert werden, so dass nach Ende einer Messung sofort die nächste Messung gestartet werden kann. Die Flusszellenhöhe beträgt 0,1 mm und wird durch die Dicke der doppelseitigen Klebefolie vorgegeben. Die Form der Flusszelle dient dazu, dass die Lösungen gleichmäßig durch den Mikroarray-Chip geleitet werden.

Die Funktionsweise des MCR3 kann als Zusammenwirken von Modulen verstanden werden, die sich im Gehäuse des MCR3 befinden. Angesteuert werden die Komponenten im System über einen Computer mit dem Programm LabVIEW 8.2, der sich außerhalb des Systems befindet. Abbildung 6.4 gibt eine Übersicht über die Verknüpfung der Pumpen und Ventile mit den Reagenzien und Puffern zu den Flusszellen der Mikroarray-Chips.

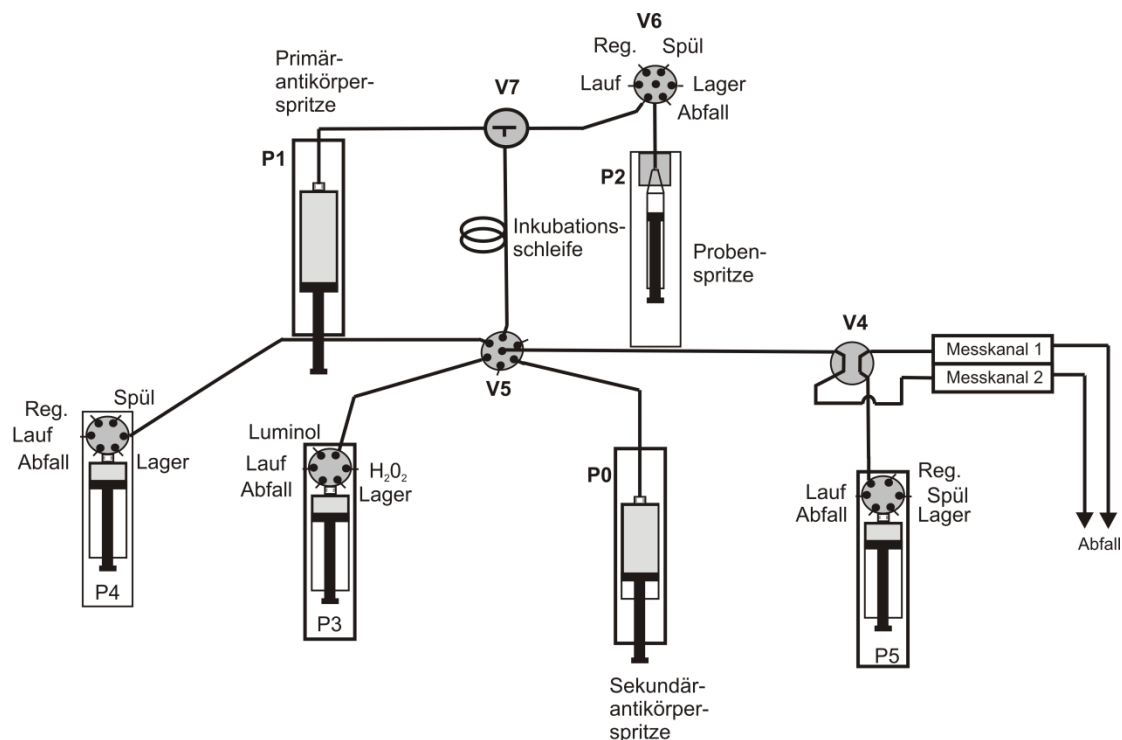


Abbildung 6.4: Fluidikplan des MCR3.

6.4.2 Messprogramme

Der MCR3 wurde jeweils zu Beginn und am Ende eines Messtages mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde der MCR3 mit den benötigten Immunoassayreagenzien, Puffern und Chemilumineszenzsubstraten (Luminol, Wasserstoffperoxid) befüllt und die Schläuche mit den jeweiligen Lösungen beladen. Der zu messende Mikroarray-Chip wurde in das System eingelegt und mit Laufpuffer befüllt. Es wurde ein Hintergrundbild aufgenommen, welches von den Messbildern abgezogen wird, um hintergrundbereinigte Aufnahmen der Spots zu erhalten. Die Standards bzw. die zu analysierenden Proben werden in 1-mL-Einwegspritzen aufgezogen, in die spezielle Vorrichtung (A) am MCR3 eingesetzt und nacheinander gemessen. Für die Analyse von Phycotoxinen und Proteotoxinen wurden verschiedene Messprogramme verwendet, die im Folgenden detailliert beschrieben werden.

6.4.2.1 Messprogramm für Antigen-Mikroarrays

0,5 mL Standard bzw. Probe wurden zusammen mit 0,5 mL Primärantikörperlösung für 1 min in der 1 mL-Inkubationsschleife des MCR3 vermischt und mit 2 $\mu\text{L/s}$ in die Flusszelle des Mikroarrays geleitet. Anschließend wurde die Flusszelle mit 2 mL Laufpuffer (Kasein) mit einer Flussrate von 500 $\mu\text{L/s}$ gespült, gefolgt von der Zugabe von 1 mL Sekundärantikörperlösung. Die Sekundärantikörperlösung wurde dabei in zwei Teilen zugegeben, wobei die ersten 200 μL mit einer Flussrate von 100 $\mu\text{L/s}$ und restlichen 800 μL mit 5 $\mu\text{L/s}$ in die Flusszelle gepumpt wurden. Nach einem weiteren Waschschrift (2 mL, 500 $\mu\text{L/s}$) wurden jeweils 250 μL Luminol und Wasserstoffperoxid gleichzeitig mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{L/s}$ in die Flusszelle geleitet und die CL-Signale 60 s lang mit der CCD-Kamera aufgezeichnet. Nach der Bildaufnahme wurde der Mikroarray wieder mit Kasein-Laufpuffer (2 mL, 500 $\mu\text{L/s}$ und 3 mL, 250 $\mu\text{L/s}$) gespült. Die Regeneration des Chips erfolgte durch die Zugabe von 4 mL Regenerationspuffer, wobei 1 mL kontinuierlich mit 10 $\mu\text{L/s}$ und die restlichen 3 mL in 600- μL -Einheiten mit 250 $\mu\text{L/s}$ in die Flusszelle geleitet wurden. Zwischen diesen Einheiten wurden jeweils 100 $\mu\text{L/s}$ fünfmal in der Flusszelle hin- und hergepumpt. Der letzte Schritt des Messprogramms war wieder ein Waschschrift (2 mL, 500 $\mu\text{L/s}$). Die Gesamtdauer des optimierten Assay betrug 20 min.

Die zur Messung der Phycotoxine verwendeten Reagenzienkonzentrationen sind in **Tabelle 6.3** aufgeführt.

Tabelle 6.3: Verwendete Reagenzien für die Messung von Phycotoxinen.

	Antikörper	Verdünnung	Konzentration [mg/L]
Primärantikörper- lösung	Anti-TNT	1:22000	0,50
	Anti-DA	1:4000	0,25
	Anti-OA	1:4000	0,25
	Anti-STX	1:4000	0,25
Sekundärantikörper- lösung	Anti-Maus	1:1000	1,00

Extraktion der Muschelproben

Die homogenisierten Muschelfleisch-Proben wurden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Für die Analyse wurde 1 g homogenisiertes Muschelfleisch in ein 25-mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen und für 10 s bei 4500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 5 mL Extraktionspuffer zugegeben. Diese Suspension wurde für 3 min mithilfe des Vortexers durchmischt und dann für weitere 10 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit PBS anhand der berechneten Verdünnungsfaktoren, welche 1:666,67 für DA, 1:9 für OA und 1:50 für STX entsprachen, verdünnt.

Kalibrierstandards

Für die Messung der Kalibrierkurven wurden die Standardlösungen in PBS hergestellt. Die gemessenen Konzentrationen waren 0, 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 $\mu\text{g/L}$ für alle drei Phycotoxine. Dabei war 1000 $\mu\text{g/L}$ die höchste gemessene Konzentration für DA und OA und 500 $\mu\text{g/L}$ für STX. Diese Kalibrierstandards entsprachen in extrahierten Muschelfleisch 0, 40, 400, 4000, $40 \cdot 10^3$, $40 \cdot 10^4$ und $40 \cdot 10^5$ $\mu\text{g/kg}$ für DA, 0, 0,54, 5,4, 54, 540, 5400 und $54 \cdot 10^3$ $\mu\text{g/kg}$ für OA und 0, 3, 30, 300, 3000, $30 \cdot 10^3$ und $150 \cdot 10^3$ $\mu\text{g kg}^{-1}$ für STX.

6.4.2.2 Messprogramm für Antikörper-Mikroarrays

Das optimierte Messprogramm für die Antikörper-Mikroarrays ist im Folgenden beschrieben. Zunächst wurden 0,3 mL Standard bzw. Probe in die Inkubationsschleife des MCR3 vorgelegt. Anschließend wurden die weiteren 0,7 mL Standard bzw. Probe mit 0,7 mL

Detektionsantikörperlösung in der Inkubationsschleife vermischt. Diese Mischung wurde in 50- μ L-Einheiten mit einer Flussrate von 10 μ L/s und einer Interaktionszeit von 10 s zwischen den Volumeneinheiten in die Flusszelle gepumpt. Nach einem Waschschrift mit PBST-Laufpuffer (2 mL, 500 μ L/s) wurde 1 mL Konjugat-Lösung (SA-PolyHRP40) in zwei Teilen in die Flusszelle zugegeben, wobei die ersten 200 μ L mit einer Flussrate von 100 μ L/s und restlichen 800 μ L mit 5 μ L/s gepumpt wurden. Nach einem weiteren Waschschrift (2 mL, 500 μ L/s) wurden jeweils 250 μ L Luminol und Wasserstoffperoxid gleichzeitig mit einer Flussrate von 10 μ L/s in die Flusszelle geleitet und die CL-Signale 60 s lang mit der CCD-Kamera aufgezeichnet. Nach der Bildaufnahme wurde der Mikroarray wieder mit PBST-Laufpuffer (2 mL, 500 μ L/s und 3 mL, 250 μ L/s) gespült. Die Gesamtdauer des Assays betrug dabei 18 min.

Die zur Messung der Phycotoxine verwendeten Reagenzienkonzentrationen sind in **Tabelle 6.4** aufgeführt.

Tabelle 6.4: Verwendete Reagenzien für Antikörper-Mikroarrays.

	Antikörper	Verdünnung	Konzentration [mg/L]
	Anti-Rizin R18/1/1-bio	1:1000	1,6
Detektionsantikörperlösung	Anti-SEB 419/5/55-bio	1:3000	0,5
	Anti-STX mAk 7H11	1:7030	0,1
Konjugatlösung	SA-PolyHRP40	1:1000	1,0

Kalibrierstandards

Für die Messung der Kalibrierkurven wurden die Standardlösungen in PBS hergestellt. Die gemessenen Konzentrationen waren 0, 0,1, 1, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 und 2000 μ g/L für Rizin, 0 – 1000 μ g/L für SEB und 0 – 500 μ g/L für STX.

Biotin-Markierung von Antikörpern

Die Biotin-Markierung von Antikörpern erfolgte unter Verwendung eines 50-fachen molaren Überschuss an Biotin. Dazu wurde eine 10 mM Biotinlösung aus Sulfo-NHS-LC-Biotin und destillierten Wasser unmittelbar vor Gebrauch vorbereitet. Diese Lösung wurde entsprechend der Konzentration der Antikörper zugesetzt. Für die Reaktion zwischen Antikörpern und

Biotin wurde diese Lösung für 2 h auf Eis gerührt. Über Nacht wurde diese Lösung mithilfe der Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Units (2 kDa) gegen PBS dialysiert, um überschüssiges Biotin zu entfernen. Die Konzentration der mit Biotin markierten Antikörper wurde anschließend am Nanophometer bestimmt.

6.4.3 Auswertung

6.4.3.1 Erstellung und Auswertung der Kalibrierungen für Antigen- und Antikörper-Mikroarrays

Für die Auswertung der Messungen wurden die Hintergrundbilder der CCD-Kamera von den Messbildern abgezogen. Durch die Verwendung des Programms MCRImageAnalyzer Version 0.3.2.1 wurden einheitslose CL-Signalwerte für die einzelnen Spots der Hintergrundkorrigierten Messbilder erhalten. Die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung der fünf Spot-Replikate erfolgte dabei über die zehn hellsten Pixel pro Spot, wobei die verwendete Software Fehlpixel nicht berücksichtigte. Die graphische Auswertung wurde mittels Origin 7.5 durchgeführt. Die Mittelwerte der Hintergrundkorrigierten CL-Signale wurden halblogarithmisch gegen die eingesetzten Toxin-Konzentrationen aufgetragen. Die Standardabweichungen der CL-Signale wurden in den Graphen als Fehlerbalken angezeigt. Durch Anwendung der vierparametrischen, logistischen Funktion wurden die sigmoidalen Kurven für Antigen- und Antikörper-Mikroarrays (**Tabelle 6.5**) erhalten.

Tabelle 6.5: Vierparametrische, logistische Fitfunktionen für Antigen- und Antikörper-Mikroarrays.

Antigen-Mikroarray	Antikörper-Mikroarrays
(Gleichung 3)	(Gleichung 4)
$Y = \frac{(A - D)}{\left[1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B\right]} + D$	$Y = \frac{(D - A)}{\left[1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B\right]} + A$

Dabei ist Y die relative Signalintensität, X die Analytkonzentration, A die maximale und D minimale Signalintensität, C der Testmittelpunkt (IC₅₀-Wert) und B die Steigung am Wendepunkt der sigmoidalen Kurve.

Zur Bestimmung unbekannter Analytkonzentrationen werden die Gleichungen 3 und 4 (Tabelle 6.6) nach X aufgelöst.

Tabelle 6.6: Bestimmung unbekannter Analytkonzentrationen nach den Gleichungen 5 und 6.

Antigen-Mikroarray	Antikörper-Mikroarrays
(Gleichung 5)	(Gleichung 6)
$X = \sqrt[B]{\left(\frac{A - D}{Y - D} - 1\right)} \cdot C$	$X = \sqrt[B]{\left(\frac{D - A}{Y - A} - 1\right)} \cdot C$

Für die Bestimmung der Nachweisgrenze (*Limit of detection*, LOD, Tabelle 6.7) wurde für die Antigen-Mikroarrays die dreifache Standardabweichung (STABW) des Blankwertes vom Signalmittelwert (MW) der Blankmessung (bzw. Nullprobenmessung) abgezogen. Im Gegensatz dazu muss die dreifache Standardabweichung für die Antikörper-Mikroarrays addiert werden (siehe Tabelle 6.7).

Tabelle 6.7: Bestimmung der Nachweisgrenze (LOD) für Antigen- und Antikörper-Mikroarrays.

Antigen-Mikroarray	Antikörper-Mikroarrays
(Gleichung 7)	(Gleichung 8)
$\text{LOD} = \text{MW} (Y_{\text{Blank}}) - 3 \cdot \text{STABW} (Y_{\text{Blank}})$	$\text{LOD} = \text{MW} (Y_{\text{Blank}}) + 3 \cdot \text{STABW} (Y_{\text{Blank}})$

Für Antigen- und Antikörper-Mikroarrays sind die Arbeitsbereiche (*Working ranges*, WR) als Intervalle von 20 bis 80% der maximalen Signalintensität definiert.

Um die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Kalibrierkurven zu analysieren wurde der Variationskoeffizient (CV) berechnet. Der Variationskoeffizient (siehe Gleichung 9) ist dabei das Verhältnis der Standardabweichung (STABW) zum Mittelwert aus den Signalintensitäten mehrerer Kalibrierkurven am Testmittelpunkt (IC_{50} -Werte).

$$CV = \frac{STABW}{MW (IC_{50})} \cdot 100\% \quad (\text{Gleichung 9})$$

6.4.3.2 Normierung der Signalintensität für Antigen- und Antikörper-Mikroarrays

Die Umrechnung der relativen Signalintensität (B/B_0) in % ergibt sich aus den folgenden Gleichungen 10 und 11 (Tabelle 6.8), wobei I die gemessene Signalintensität darstellt.

Tabelle 6.8: Berechnung der relativen Signalintensität in %.

Antigen-Mikroarray	Antikörper-Mikroarrays
(Gleichung 10)	(Gleichung 11)
$\frac{B}{B_0} = \frac{(I - D)}{(A - D)} \cdot 100\%$	$\frac{B}{B_0} = \frac{(I - A)}{(D - A)} \cdot 100\%$

Die Berechnung der relativen Standardabweichung $STABW_{\text{Relativ}}$ in % der generierten Signalintensitäten erfolgt für Antigen- und Antikörper-Mikroarrays durch Anwendung der Gleichungen 12 und 13.

Tabelle 6.9: Berechnung der relativen Standardabweichung $STABW_{\text{rel}}$.

Antigen-Mikroarray	Antikörper-Mikroarrays
(Gleichung 12)	(Gleichung 13)
$STABW_{\text{Relativ}} = \frac{STABW}{(A - D)} \cdot 100\%$	$STABW_{\text{Relativ}} = \frac{STABW}{(D - A)} \cdot 100\%$

6.4.3.3 Regeneration für Antigen-Mikroarrays

Da das Regenerationsprofil eine Abnahme der Signalintensitäten für die Antigen-Mikroarrays zeigte, wurden die Regenerationskurven gemäß Gleichung 14 normiert, indem die Signalintensitätswerte der ersten Blankmessung als $CL_{\text{Blank, Anfang}}$ bezeichnet und auf 100% gesetzt wurden. Zur Unterscheidungen der weiteren Blankmessungen wurden diese je nach ihrer Messposition als $CL_{\text{Blank, } x}$ bezeichnet.

$$CL_{\text{Normiert, } x} = \frac{CL_{\text{Blank, } x}}{CL_{\text{Blank, Anfang}}} \cdot 100\% \quad (\text{Gleichung 14})$$

6.4.3.4 Korrektur der Wiederfindungsraten für Antigen-Mikroarrays

Korrekturmethode I

Um für die Bestimmung der Wiederfindungsraten eine Korrektur des Regenerationseffektes zu erreichen, wird das Verhältnis aus der Blankmessung (CL_{Blank}) vor der Kalibrierung mit der Blankmessung (CL_{Referenz}) vor der Probenmessung gebildet und dieser ermittelte Korrekturfaktor mit dem CL-Signal der kontaminierten Probe multipliziert. Die vorgenommene mathematische Korrektur ist in Gleichung 15 wiedergegeben.

$$CL_{\text{Probe, korrigiert}} = \frac{CL_{\text{Blank}}}{CL_{\text{Referenz}}} \cdot CL_{\text{Probe}} \quad (\text{Gleichung 15})$$

Korrekturmethode II

Eine weitere Möglichkeit den Regenerationseffekt zu korrigieren, basiert auf dem Regenerationsprofil jedes Phycotoxins. Die Phycotoxine DA und OA zeigen einen linearen Abfall der Signalintensität, so dass die Blankmessungen (CL_{Referenz}) vor den Probenmessungen mithilfe der Gleichung 16 gefittet werden.

$$y = a + b \cdot x \quad (\text{Gleichung 16})$$

Nach Normierung der Geradengleichungen wurden diese auf jede Messposition (x) angewandt. Anschließend wurde für jede Messposition ein Korrekturfaktor bestimmt, indem der Kehrwert gebildet wurde. Mit den berechneten Korrekturfaktoren wurden alle gemessenen Signalintensitäten korrigiert und durch Anwendung der vierparametrischen, logistischen Funktion wurden die korrigierten sigmoidalen Kurven erhalten. Mithilfe der Gleichung 5 wurden die korrigierten Wiederfindungsraten bestimmt.

Die Regeneration von STX zeigte einen exponentiellen CL-Signalabfall. Für die Bestimmung der Fitfunktionen wurden zu den Blankmessungen vor jeder Probenmessung auch die Blankmessungen vor der Kalibrierung verwendet, wobei als resultierende Fitfunktion ein exponentieller Abfall 1. Ordnung erhalten wurde.

$$y = y_0 + a \cdot e^{\left(\frac{-x}{t}\right)} \quad (\text{Gleichung 17})$$

Nach dem gleichen Verfahren wie für den linearen Abfall wurden die Korrekturfaktoren berechnet, die korrigierten Kalibrierkurven erstellt sowie die korrigierten Wiederfindungsraten bestimmt.

6.5 ELISA

6.5.1 Puffer

Stopplösung (5% H₂SO₄-Lösung)

98% H₂SO₄, 50 mL

Wasser, ad 1000 mL

Substratpuffer pH 3,8

Kaliumdihydrogencitrat, 46,04 g

Kaliumsorbat, 0,10 g

Wasser, ad 1000 mL

Substratlösung

Substratpuffer, 25 mL

TMB-Stammlösung, 500 µL

H₂O₂ (1%), 100 µL

TMB-Stammlösung

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 250 mg

DMSO, 20 mL

Waschpufferkonzentrat

KH₂PO₄, 8,17 g

K₂HPO₄, 73,16 g

NaCl, 52,6 g

Tween20, 30 mL

Wasser, ad 1000 mL

Waschpuffer ELISA (pH 7,6)

Waschpufferkonzentrat, 42 mL

Wasser, ad 2500 mL

6.5.2 Durchführung

Der ELISA wurde in 96-well Mikrotiterplatten mit flachem Boden und hoher Bindungskapazität durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden die Messungen verwendet, die ohne die Zugabe von Analyten erfolgten. Der verwendete Antikörper mAk R109/3 wurden auf eine Konzentration von 10 mg/L mit PBS-Puffer verdünnt. Je 50 µL der verdünnten Antikörper-Lösungen wurden in die Kavitäten pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nicht immobilisierte Antikörper wurden durch das dreimalige Waschen mit 300 µL Waschpuffer entfernt. Freie Bindungsstellen der Mikrotiterplatte wurden für 2 Stunden mit 200 µL einer 2% Kasein-Lösung bei RT auf dem Schüttler inaktiviert. Nach dem Blocken erfolgte ein weiterer dreimaliger Waschschrift. Anschließend wurden die Kalibrierstandards in den Konzentrationen 0 – 1000 µg/L Agglutinin bzw. Rizin durch Verdünnung mit PBST hergestellt. Jeweils 50 µL der hergestellten Kalibrierstandards wurden in die Kavitäten pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3 x 300 mL) wurden 50 µL R18/1-bio-RKI in einer Verdünnung von 1:640 in PBST bzw. R18/1-bio in einer Verdünnung von 1:1000 in PBST zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde wieder 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und anschließend gewaschen (3 x 300 mL). Um eine Farbreaktion zu ermöglichen, wurden jeweils 50 µL SA-HRP und SA-PolyHRP40, beide in einer Verdünnung von 1:5000, in die Kavitäten gefüllt. Nach einer einstündigen Inkubation wurde die Platte gewaschen (3 x 300 mL) und es wurden je 100 µL einer frisch hergestellten Substratlösung in die Kavitäten gefüllt. Bei Raumtemperatur wurde unter Abdunkelung mit Alufolie etwa 5 min auf dem Schüttler inkubiert, bis eine ausreichende Blaufärbung sichtbar wurde. Eine weitere Verdunklung der Färbung wurde durch Zugabe von je 100 µL Stopplösung verhindert, woraufhin die Farbe von

blau nach gelb umschlug. Bei 450 nm wurde die Farbintensität am Auslesegerät Synergy HT mit Hilfe der Software Gen05 gemessen, wobei jeder Messpunkt vierfach bestimmt wurde.

7 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
a.u.	<i>arbitrary unit</i> (willkürliche Einheit)
CD	<i>Charged coupled device</i> (Digitalkamera)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDR	<i>Complementarity determining regions</i>
CL	Chemilumineszenz
CWÜ	Chemiewaffen-Übereinkommen
Da	Dalton
DA	Domainsäure
DAPEG	Diamino-Polyethylenglykol
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DSC	Di(<i>N</i> -succinimidyl)carbonat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (enzymgekoppelter Immunoassay)
FL	Fluoreszenz
GOPTS	3-Glycidylxypropyltrimethoxysilan
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IC ₅₀	Testmittelpunkt der ELISA-Kalibrierkurve
Ig	Immunglobuline
K _d	Dissoziationskonstante

KR	Kreuzreaktivität
LC	<i>Liquid chromatotography</i> (Flüssigkeitschromatographie)
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
LOD	<i>Limit of detection</i> (Nachweisgrenze)
mAk	monoklonaler Antikörper
MTP	Mikrotiterplatte
MCR 3	<i>Munich Chip Reader 3</i>
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
OA	Okadasäure
pAk	polyklonaler Antikörper
PEG	Polyethylenglykol
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SEB	<i>Staphylococcal enterotoxin B</i>
SDS	Sodium dodecyl sulphate (Natriumdodecylsulfat)
STX	Saxitoxin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMP	Testmittelpunkt
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
w/v	Massenprozent
WHO	<i>World Health Organization</i>

8 Literatur

- [1] Chemgapedia, *Glossar: Biotoxin*,
<http://www.chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/b/bi/biotoxin.glos.html>,
22.01.2013.
- [2] Russmann, H., *Toxine - Biogene Gifte und potentielle Kampfstoffe*,
Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, **2003**, 46, 989-
996.
- [3] Thieme, RÖMPP Online, <http://www.roempp.com/prod>, **22.01.2013.**
- [4] Franz, R., *Defense against toxin weapons*, Medical aspects of chemical and biological
warfare, Textbook of military medicine, Washington D.C., **1997.**
- [5] Depner, R., *Alles Nervensache? Wie unser Nervensystem funktioniert - oder auch
nicht*, Schattauer, Stuttgart, **2012.**
- [6] Labor Spiez, *Fact Sheet: Staphylococcus enterotoxin B (SEB)*, [http://www.labor-
spiez.ch/de/dok/fa/pdf/fact_Sheet_SEB_d_10011946456.pdf](http://www.labor-spiez.ch/de/dok/fa/pdf/fact_Sheet_SEB_d_10011946456.pdf), **22.01.2013.**
- [7] Leitenberger, B., *Lebensmittelverderb und Lebensmittelvergiftungen durch Bakterien
und Pilze*, <http://www.bernd-leitenberger.de/lebensmittelvergiftungen.shtml>,
22.01.2013.
- [8] Moore, S., Trainer, V., Mantua N., Parker, M., Laws, E., Backer, L., Fleming, L.,
*Impacts of climate variability and future climate change on harmful algal blooms and
human health*, Environ. Health, **2008**, 7, 4 - 16
- [9] Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), *Bewertung von marinen Biotoxinen in
Lebensmitteln*,
[http://www.bfr.bund.de/de/bewertung_von_marinen_biotoxinen_in_lebensmitteln-
62066.html](http://www.bfr.bund.de/de/bewertung_von_marinen_biotoxinen_in_lebensmitteln-62066.html), **22.01.2013.**

-
- [10] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), *Emergency preparedness and response - bioterrorism*, <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>, **23.01.2013**.
- [11] World Health Organization (WHO), *Frequently asked questions regarding the deliberate use of biological agents and chemicals as weapons*, <http://who.int/csr/delibepidemics/faqbioagents/en/print.html>, **23.01.2013**.
- [12] Guery M., *Bulletin zur schweizerischen Sicherheitspolitik 2005, Risiko- und Verwundbarkeitsanalyse Bioterrorismus*, <http://www.isn.ethz.ch/isn/Digital-Library/Publications>, **23.01.2013**.
- [13] Zunder S., *Die Bedrohung durch den Bioterrorismus und das Management „biologischer Gefahrenlagen“ in Deutschland*, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, **2004**.
- [14] Iraq Watch, *Final compendium (S/1999/94), disarmament report*, http://www.iraqwatch.org/un/Index_UNSCOM.html, **23.01.2013**.
- [15] Wein, L., Liu, Y., *Analyzing a bioterror attack on the food supply: The case of botulinum toxin in milk*, PNAS, **2004**, 102, 9984 - 9989.
- [16] Labor Spiez, *Fact sheet: Saxitoxin*, http://www.labor-spiez.ch/de/dok/fa/pdf/fact_sheet_saxitoxin_d_07_2012.pdf, **24.01.2013**.
- [17] Ledochowski, M., *Klinische Ernährungsmedizin*, Springer Wien New York, **2010**.
- [18] Gamal, A., *Biological importance of marine algae*, Saudi Pharm. J., **2012**, 18, 1 - 25.
- [19] Dubois, M., Demoulin, L., Charlier, C., Singh, G., Godefroy, S., Campbell, K., Elliott, C., Delahaut, P., *Development of ELISAs for detecting domoic acid, okadaic acid and saxitoxin and their applicability for the detection of marine toxins in samples collected in Belgium*, Food Addit. Contam. A, **2010**, 27, 859 - 868.
- [20] Barceloux, D., *Medical toxicology of natural substances*, John Wiley & Sons, New Jersey, **2008**.

- [21] Whittle, K., Gallacher, S., *Marine toxins*, BMJ, **2000**, 56, 236 - 253.
- [22] Pulido, O., *Domoic acid toxicology pathology: A review*, Mar. Drugs, **2008**, 6, 180 - 219.
- [23] Hinder, S. L., Hays, G. C., Brooks, C. J., Davies, A. P., Edwards, M., Walne, A. W., Gravenor, M. B., *Toxic marine microalgae and shellfish poisoning in the British isles: History, review of epidemiology, and future implications*, Environ. Health, **2011**, 10.
- [24] Economou, V., Papadopoulou, C., Brett, M., Kansouzidou, A., Charalabopoulos, K., Filioussis, G., Seferiadis, K., *Diarrhetic shellfish poisoning due to toxic mussel consumption: The first recorded outbreak in Greece*, Food Addit. Contam., **2007**, 24, 297 - 305.
- [25] McLaughlin, J. B., Fearey, D. A., Esposito, T. A., Porter, K. A., *Paralytic shellfish poisoning - southeast Alaska, May - June 2011*, MMWR, **2011**, 60, 1554 - 1556.
- [26] Garthwaite, I., Ross, K., Miles, C., Briggs, L., Towers, N., Borrell, T., Busby, P., *Integrated enzyme-linked immunosorbent assay screening system for amnesic, neurotoxic, diarrhetic, and paralytic shellfish poisoning toxins found in New Zealand*, J. AOAC Int., **2001**, 84, 1643 - 1648.
- [27] Ujevic, I., Nincevic-Gladan, Z., Roje, R., Skejic, S., Arapov, J., Marasovic, I., *Domoic acid - a new toxin in the croatian adriatic shellfish toxin profile*, Molecules, **2010**, 15, 6835 - 6849.
- [28] Zhou, M., Li, J., Luckas, B., Yu, R., Yan, T., Hummert, C., Kastrop, S., *A recent shellfish toxin investigation in China*, Mar. Pollut. Bull., **1999**, 39, 331-334.
- [29] Van Dolah, F., *Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence*, Environ. Health Perspect., **2000**, 108, 133 - 141.
- [30] Campas, M., Prieto-Simon, B., Marty, J. L., *Biosensors to detect marine toxins: Assessing seafood safety*, Talanta, **2007**, 72, 884 - 895.

-
- [31] Taleb, H., Vale, P., Blaghen, M., *Study of paralytic shellfish poisoning toxin profile in shellfish from the Mediterranean shore of Morocco*, *Toxicon*, **2001**, 39, 1855 - 1861.
- [32] European Commission, *Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29. April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin*, *Off. J. Eur. Union L 139*, **2004**.
- [33] Jeffery, B., Barlow, T., Moizer, K., Paul, S., Boyle, C., *Amnesic shellfish poison*, *Food Chem. Toxicol.*, **2004**, 42, 545 - 557.
- [34] Todd, E., *Domoic acid and amnesic shellfish poisoning: A review*, *J. Food Protect.*, **1993**, 56, 69 - 83.
- [35] Paredes, I., Rietjens, I., Vieites, J., Cabado, A., *Update of risk assessments of main marine biotoxins in the European Union*, *Toxicon*, **2011**, 58, 336 - 354.
- [36] McCarron, P., Hess, P., *Tissue distribution and effects of heat treatments on the content of domoic acid in blue mussels, Mytilus edulis*, *Toxicon*, **2006**, 47, 473 - 479.
- [37] Lefebvre, K., Robertson, A., *Domoic acid and human exposure risks: A review*, *Toxicon*, **2010**, 56, 218 - 230.
- [38] Wright, J., Boyd, R., Freitas, A., Falk, M., Foxall, R., Jamieson, W., Laycock, M., McCulloch, W., McInnes, A., Odense, P., Pathak, V., Quilliam, M., Ragan, M., Sim, P., Thibault, P., Walter, J., *Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island*, *Can. J. Chem.*, **1989**, 67, 481 - 490.
- [39] EFSA, *Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain (CONTAM), marine biotoxins in shellfish - domoic acid*, *The EFSA Journal*, **2009**, 1181, 1 - 61.
- [40] Dominguez, H., Paz, B., Daranas, A., Norte, M., Franco, J., Fernandez, J., *Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: Characterization, analysis and human health implications*, *Toxicon*, **2010**, 56, 191 - 217.

-
- [41] Kat, M., *Diarrhetic mussel poisoning in the Netherlands related to the dinoflagellate *Dinophysis acuminata**, Anton. Leeuw., **1983**, 49, 417 - 427.
- [42] Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M., *Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku District*, Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish, **1978**, 44, 1249 - 1255.
- [43] Boudreau, R., Hoskin, D., *The use of okadaic acid to elucidate the intracellular role(s) of protein phosphatase 2A: Lessons from the mast cell model system*, Int. Immunopharmacol., **2005**, 5, 1507 - 1518.
- [44] Takai, A., Murata, M., Torigoe, K., Isobe, M., Mieskes, G., Yasumoto, T., *Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases*, Biochem. J., **1992**, 284, 539 - 544.
- [45] Garcia, A., Cayla, X., Guergnon, J., Dessauge, F., Hospital, V., Rebollo, M., Fleischer, A., Rebollo, A., *Serine/threonine protein phosphatases PPI and PP2A are key players in apoptosis*, Biochimie, **2003**, 85, 721 - 726.
- [46] Suganuma, M., Suguri H., Yoshizawa, S., Hirota, M., Nakayasu, M., Ojika, M., Wakamatsu, K., Yamada, K., Sugimura, T., *Okadaic acid - an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter*, PNAS, **1988**, 85, 1768 - 1771.
- [47] Wiese, M., D'Agostino, P., Mihali, T., Moffit, M., Neilan, B., *Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs*, Mar. Drugs, **2010**, 8, 2185 - 2211.
- [48] EFSA, *Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain (CONTAM), marine biotoxins in shellfish - saxitoxin group*, The EFSA Journal, **2009**, 1019, 1 - 76.
- [49] Wang, D., *Neurotoxins from marine dinoflagellates: A brief review*, Mar. Drugs, **2008**, 6, 349 - 371.
- [50] Catterall, W., *From ionic currents to molecular review mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels*, Neuron, **2000**, 26, 13 - 25.

-
- [51] Schantz, E., Johnson, E., *Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine*, Microbiol. Reviews, **1992**, 56, 80 - 99.
- [52] Etheridge, S., *Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives*, Toxicon, **2010**, 56, 108 - 122.
- [53] Kao, C., *Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena*, Pharmacol. Rev., **1966**, 18, 997 - 1049.
- [54] Hellwig, E., Petuely, F., *Determination of saxitoxin in canned shellfish*, Z. Lebensm. Unters. For., **1980**, 171, 165 - 169.
- [55] Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW), *Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction*, <http://www.opcw.org/chemicalweapons-convention/download-the-cwc>, **07.02.2013**.
- [56] Bundesministerium der Justiz, *Anlage (zu § 1 Abs. 1) Kriegswaffenliste*, http://www.gesetze-im-internet.de/krwaffkontrg/anlage_46.html, **07.02.2013**.
- [57] Tanino, H., Nakata, T., Kaneko, T., Kishi, Y., *A stereospecific total synthesis of dl-Saxitoxin*, J. Am. Chem. Soc., **1977**, 99, 2818 - 2819.
- [58] Schantz, E., *Biochemical studies on paralytic shellfish poison*, Ann. NY Acad. Sci., **1960**, 90, 843 - 855.
- [59] Burrows, W., Renner, S., *Biological warfare agents as threats to potable water*, Environ. Health Perspect., **1999**, 107, 975-984.
- [60] Audi, J., Belson, M., Patel, M., Schier, J., Osterloh, J., *Ricin poisoning - a comprehensive review*, JAMA, **2005**, 294, 2342 - 2351.
- [61] Pita, R., *Toxin weapons: From World War I to jihadi terrorism*, Toxin Rev., **2009**, 219 - 237.

-
- [62] Labor Spiez, *Fact Sheet: Ricin*, http://www.labor-spiez.ch/de/dok/fa/pdf/fact_sheet_ricin_2010_d.pdf, **28.01.2013**.
- [63] Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe, *Biologische Gefahren II - Entscheidungshilfen zu medizinisch angemessenen Vorgehensweisen in einer B-Gefahrenlage*, Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe, Bonn, **2007**.
- [64] Zilinskas, R., *Iraq's biological weapons*, JAMA, **1997**, 278, 418 - 424.
- [65] Papaloukas, M., Papaloucas, C., Stergioulas, A., *Ricin and the assassination of Georgi Markov*, Pak. J. Biol. Sci., **2008**, 11, 2370 - 2371.
- [66] U.S. Department of Health and Human Services, *Response to a ricin incident: Guidelines for federal, state, and local public health and medical officials*, http://emergency.cdc.gov/agent/ricin/pdf/ricin_protocol.pdf, **08.02.2013**.
- [67] CNN, *Timeline: UK ricin terror probe*, <http://edition.cnn.com/2003/WORLD/europe/01/15/ricin.timeline/index.html>, **28.01.2013**.
- [68] Challoner, K., McCarron, M., *Castor bean intoxication*, Ann. Emerg. Med., **1990**, 19, 1177 - 1183.
- [69] Katzin, B., *Structure of ricin A-chain at 2.5 Å*, Proteins Struct. Funct. Bioinf., **1991**, 10, 251 - 259.
- [70] Hartley, M., Lord, J., *Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants*, Biochim. Biophys. Acta, **2004**, 1701, 1 - 14.
- [71] Rutenber, E., Robertus, J., *Structure of ricin B-chain at 2.5 Å*, Proteins Struct. Funct. Bioinf., **1991**, 10, 260 - 269.
- [72] Bradberry, S., *Ricin and abrin*, Medicine, **2007**, 35, 576 - 577.

-
- [73] Musshoff, F., Madea, B., *Ricin poisoning and forensic toxicology*, Drug Test. Analysis, **2009**, 1, 184 - 191.
- [74] Sandvig, K., Deurs, B., *Endocytosis and intracellular transport of ricin: Recent discoveries*, FEBS Lett., **1999**, 452, 67 - 70.
- [75] Cashman, J., *Emergency response handbook for chemical and biological agents and weapons*, CRC Press, Taylor & Francis Group, USA, **2008**.
- [76] Stechmann, B., Bai, S., Gobbo, E., Merer, G., Pinchard, S., Panigai, L., Tenza, D., Raposo, G., Beaumelle, B., Sauvaire, D., Grillet, D., Johannes, L., Barbier, J., *Inhibition of retrograde transport protects mice from lethal ricin challenge*, Cell, **2010**, 141, 231 - 242.
- [77] Sphyris, N., Lord, J., Wales, R., Roberts, L., *Mutational analysis of the Ricinus lectin B-chains*, J. Biol. Chem., **1995**, 270, 20292 - 20297.
- [78] Pauly, D., *Entwicklung eines antikörperbasierten Multiplex-Detektionssystems zum Nachweis von bioterroristisch relevanten Toxinen*, Dissertation, Universität Potsdam, **2008**.
- [79] Food Standards Australia New Zealand, *Scientific evaluation of pasteurisation for pathogen reduction in milk and milk products*, http://www.elika.net/datos/articulos/Archivo243/FSANZ_Pasteurizacion07.pdf, **05.08.2013**.
- [80] Balaban, N., Rasooly, A., *Staphylococcal enterotoxins*, Int. J. Food Microbiol., **2000**, 61, 1 - 10.
- [81] Ahanotu, E., Alvelo-Ceron, D., Ravita, T., Gaunt, E., *Staphylococcal enterotoxin B as a biological weapon: recognition, management, and surveillance of Staphylococcal enterotoxin*, ABSA, **2006**, 11, 120 - 126.
- [82] Becker, H., Bürk, C., Märtlbauer, E., *Staphylokokken-Enterotoxine: Bildung, Eigenschaften und Nachweis*, J. Verbr. Lebensm., **2007**, 2, 171 - 189.

-
- [83] Wikimedia commons, *Staphylococcus aureus*,
http://commons.wikimedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus?uselang=de, **29.01.2013**.
- [84] Brosnahan, A., Schlievert, P., *Gram-positive bacterial superantigen outside-in signaling causes toxic shock syndrome*, FEBS J. , **2011**, 278, 4649 - 4667.
- [85] Papageorgiou, A., Tranter, H., Acharya, K., *Crystal structure of microbial superantigen Staphylococcal enterotoxin B at 1.5 Å resolution: Implications for superantigen recognition by MHC Class II molecules and T-cell receptors*, J. Mol. Biol., **1998**, 277, 61 - 79.
- [86] Proft, T., Fraser, J., *Bacterial superantigens*, Cli. Exp. Immunol., **2003**, 133, 299 - 306.
- [87] Rusnak, J., Korperter, M., Ulrich, R., Poli, M., Boudreau, E., *Laboratory exposures to Staphylococcal enterotoxin B*, Emer. Infect. Dis., **2004**, 10, 1544 - 1549.
- [88] Lottspeich, F., Engels, J., *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2009**.
- [89] Horn, F., Moc, I., Schneider, N., Grillhösl, C., Berghold, S., Lindenmeier, G., *Biochemie des Menschen*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, **2005**.
- [90] Lottspeich F., E. J., *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2009**.
- [91] Nelson, D., Cox, M., *Biochemie*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **2009**.
- [92] Voet, D., Voet, J., Pratt C., *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2010**.
- [93] Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L., *Stryer Biochemie*, Elsevier, München, **2007**.
- [94] Mantis, N., *Vaccines against the category B toxins: Staphylococcal enterotoxin B, epsilon toxin and ricin*, Adv. Drug Delivery Rev., **2005**, 57, 1424 - 1439.

- [95] Pauly, D., Kirchner, S., Stoermann, B., Schreiber, T., Kaulfuss, S., Schade, R., Zbinden, R., Avondet, M., Dorner, M. B., Dorner, B., *Simultaneous quantification of five bacterial and plant toxins from complex matrices using a multiplexed fluorescent magnetic suspension assay*, *Analyst*, **2009**, 134, 2028 - 2039.
- [96] Yermakova, A., Nicholas, N., *Protective immunity to ricin toxin conferred by antibodies against the toxin's binding subunit (RTB)*, *Vaccine*, **2011**, 29, 7925 - 7935.
- [97] Murphy, K., Travers, P., Walport, M., *Janeway's Immunobiology*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2009**.
- [98] Segenthaler, W., Blum, H., *Klinische Pathophysiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2006**.
- [99] Shoenfeld, Y., *The idiotypic network in autoimmunity: Antibodies that bind antibodies that bind antibodies*, *Nat. Med.*, **2004**, 10, 17 - 18.
- [100] Pan, Y., Yuhasz, S., Amzel, M., *Anti-idiotypic antibodies: Biological function and structural studies*, *FASEB J.*, **1995**, 9, 43 - 49.
- [101] Chanh, T., Kennedy, R., Hewetson, J., *Anti-idiotypic vaccines in toxicology*, *Int. J. Clin. Lab. Res.*, **1992**, 22, 28 - 35.
- [102] Venturini, A., Bresjanac, M., Vranac T., Koren, S., Narat, M., Popović, M., Šerbec, V., *Anti-idiotypic antibodies: A new approach in prion research*, *BMC Immunology*, **2009**, 10, 16 - 30.
- [103] Akkoyun, A., Kohen, V., Bilitewski, U., *Detection of sulphamethazine with an optical biosensor and anti-idiotypic antibodies*, *Sens. Actuators B*, **2000**, 70, 12 - 18.
- [104] Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), *Analytik mariner Biotoxine*, http://www.bfr.bund.de/cm/343/positionspapier_analytik_mariner_biotoxine.pdf, **08.02.2013**.
- [105] Vilarino, N., Louzao, M., Vieytes, M., Botana, L., *Biological methods for marine toxin detection*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, 397, 1673-1681.

-
- [106] European Commission, *Verordnung (EG) Nr. 2074/2005*, Off. J. Eur. Union L 139, **2004**, 55 - 205.
- [107] Lawrence, J., Charbonneau, C., Menard, C., *Liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish products using the paralytic shellfish poisoning extraction procedure of the Association of Official Analytical Chemists*, J. Chromatogr., **1989**, 462, 349 - 356.
- [108] van Apeldoorn, M., van Egmond, H., Speijers, G., *Amnesic shellfish poisoning - A review*, RIVM report 388802019, **1999**, Niederlande.
- [109] Draisci, R., Croci, L., Giannetti, L., Cozzi, L., Lucentinin, L., Medici, D., Stacchini, A., *Comparison of mouse bioassay, HPLC and enzyme immunoassay methods for the determining diarrhoetic shellfish poisoning toxins in mussels*, Toxicon, **1994**, 32, 1379 - 1384.
- [110] Hess, P., *Requirements for screening and confirmatory methods for the detection and quantification of marine biotoxins in end-product and official control*, Anal. Bioanal. Chem., **2010**, 397, 1683 - 1694.
- [111] Garet, E., Gonzalez-Fernandez, A., Lago, J., Vieites, J., Cabado, A., *Comparative evaluation of enzyme-linked immunoassay and reference methods for the detection of shellfish hydrophilic toxins in several presentations of seafood*, J. Agri. Food Chem., **2010**, 58, 1410 - 1415.
- [112] Quilliam, M., *The role of chromatography in the hunt for red tide toxins*, J. Chromatogr. A, **2003**, 1000, 527 - 548.
- [113] Pocklington, R., Milley, J., Bates, S., Bird, C., Freitas, A., Quilliam, M., *Trace determination of domoic acid in sea water and phytoplankton by high-performance liquid chromatography of the fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) derivative*, Int. J. Environ. Anal. Chem., **1990**, 38, 351 - 368.

- [114] Mafra, L., Leger, C., Bates, S., Quilliam, M., *Analysis of trace levels of domoic acid in seawater and plankton by liquid chromatography without derivatization, using UV or mass spectrometry detection*, J. Chromatogr. A, **2009**, 1216, 6003 - 6011.
- [115] Botana, L., *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology and detection*, CRC Press, Taylor & Francis Group, USA, **2008**.
- [116] Lee, J., Yanagi, T., Kenma, R., *Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography*, Agric. Biol. Chem., **1987**, 51, 877 - 881.
- [117] Goto, H., Igarashi, T., Yamamoto, M., Yasuda, M., Sekiguchi, R., Watai, M., Tanno, K., Yasumoto, T., *Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **2001**, 907, 181 - 189.
- [118] Draiscia, R., Palleschia, L., Giannettia, L., Lucentinia, L., Jamesb, K., Bishopb, A., Satake, M., Yasumoto, T., *New approach to the direct detection of known and new diarrhoeic shellfish toxins in mussels and phytoplankton by liquid chromatography–mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **1999**, 847, 213 - 221.
- [119] Regueiro, J., Rossignoli, A., Alvarez, G., Blanco, J., *Automated on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of lipophilic marine toxins in shellfish*, Food Chem., **2011**, 129, 533 - 540.
- [120] Bates, H., Rapoport, H., *A chemical assay for saxitoxin, the paralytic shellfish poison*, J. Agric. Food Chem., **1975**, 23, 237 - 239.
- [121] Oshima, Y., Hasegawa, M., Yasumoto, T., Hallegraff, G., Blackburn, S., *Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish*, Toxicon, **1987**, 25, 1105 - 1111.
- [122] Oshima, Y., *Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins*, J. AOAC, **1995**, 78, 528 - 532.

-
- [123] Luckas, B., *Phycotoxins in seafood - toxicological and chromatographic aspects*, J. Chromatogr., **1992**, 624, 439 - 456.
- [124] Humpage, A., Magalhaes, V., Froscio, S., *Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins*, Anal. Bioanal. Chem., **2010**, 397, 1655 - 1671.
- [125] Lawrence, J., Menard C., *Liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish after prechromatographic oxidation*, AOAC, **1991**, 74, 1006 - 1012.
- [126] Lawrence, J., Niedzwiadek, B., Menard, C., *Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: Collaborative study*, AOAC, **2005**, 88, 1714 - 1732.
- [127] Jaime, E., Hummert, C., Hess, P., Luckas, B., *Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by high-performance ionexchange chromatography*, J. Chromatogr., **2001**, 929, 43 - 49.
- [128] Dell'Aversano, C., Eaglesham, G., Quillam, M., *Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry*, J. Chromatogr., **2004**, 1028, 155 - 164.
- [129] Zhang, J., Liu, S., Yang, P., Sui, G., *Rapid detection of algal toxins by microfluidic immunoassay*, Lab Chip, **2011**, 11, 3516 - 3522.
- [130] Llewellyn, L., *Predictive toxinology: An initial foray using calculated molecular descriptors to describe toxicity using saxitoxins as a model*, Toxicol., **2007**, 50, 901 - 913.
- [131] Rossini, G., *Functional assays in marine biotoxin detection*, Toxicology, **2005**, 207, 451 - 462.

-
- [132] Amzil, Z., Pouchus, Y., Leboterff, J., Roussakis, C., Verbist, J., Marcailloulebaut, C., Masselin, P., *Short-time cytotoxicity of mussel extracts - A new bioassay for okadaic acid detection*, *Toxicon*, **1992**, 30, 1419 - 1425.
- [133] Tubaro, A., Florio, C., Luxich, E., Vertua, R., DellaLoggia, R., Yasumoto, T., *Suitability of the MTT-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels*, *Toxicon*, **1996**, 34, 965 - 974.
- [134] Flanagan, A., Callanan, K., Donlon, J., Palmer, R., Forde, A., Kane, M., *A cytotoxicity assay for the detection and differentiation of two families of shellfish toxins*, *Toxicon*, **2001**, 39, 1021 - 1027.
- [135] Leira, F., Alvarez, C., Cabado, A., Vieites, J., Vieytes, M., Botana, L., *Development of a F actin-based live-cell fluorimetric microplate assay for diarrhetic shellfish toxins*, *Anal. Biochem.*, **2003**, 317, 129 - 135.
- [136] Kogure, K., Tamplin, M., Simidu, U., Colwell, R., *A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins*, *Toxicon*, **1988**, 26, 191 - 197.
- [137] Manger, R., Leja, L., Lee, S., Hungerford, J., Wekell, M., *Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: Semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins and ciguatoxins*, *Anal. Biochem.*, **1993**, 214, 190 - 194.
- [138] Jellett, J., Marks, L., Stewart, J., Dorey, M., Watson-Wright, W., Lawrence, J., *Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays: Automated endpoint determination and standardization of the in vitro tissue culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay*, *Toxicon*, **1992**, 30, 1157 - 1164.
- [139] Okumura, M., Tsuzuki, H., Tomita, B., *A rapid detection method for paralytic shellfish poisoning toxins by cell bioassay*, *Toxicon*, **2005**, 46, 93 - 98.
- [140] Louzao, M., Vieytes, M., Cabado, A., Vieites, J., Botana, L., *A fluorimetric microplate assay for detection and quantitation of toxins causing paralytic shellfish poisoning*, *Chem. Res. Toxicol.*, **2003**, 16, 433 - 438.

- [141] Van Dolah, F., Leighfield, T., Haynes, B., Hampson, D., Ramsdell, J., *A microplate receptor assay for the amnesic shellfish poisoning toxin, domoic acid, utilizing a cloned glutamate receptor*, Anal. Biochem., **1997**, 245, 102 - 105.
- [142] Tubaro, A., Florio, C., Luxich, E., Sosa, S., DellaLoggia, R., Yasumoto, T., *A protein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels*, Toxicon, **1996**, 34, 743-752.
- [143] Vieytes, M., Fontal, O., Leira, F., Vieites, J., Botana, L., *A fluorescent microplate assay for diarrheic shellfish toxins*, Anal. Biochem., **1997**, 248, 258 - 264.
- [144] Mountfort, D., Suzuki, T., Truman, P., *Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels*, Toxicon, **2001**, 39, 383 - 390.
- [145] Pei, X., Zhang, B., Tang, J., Liu, B., Lai, W., Tang, D., *Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review*, Anal. Chim. Acta, **2013**, 758, 1 - 18.
- [146] Bilitewski, U., *Can affinity sensors be used to detect contaminants?*, Anal. Chem., **2000**, 72, 692 A - 701 A.
- [147] Hock, B., *Antibodies for immunosensors: A review*, Anal. Chim. Acta, **1997**, 347, 177 - 186.
- [148] Pico, Y., *Food toxicants analysis: Techniques, strategies and developments*, Amsterdam, **2007**.
- [149] Raem, A., Rauch, P., *Immunoassays*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2006**.
- [150] Darwish, I., *Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: Basic methodology and recent advances*, Int. J. Biomed. Sci., **2006**, 2, 217-235.
- [151] Tomizaki, K., Usui, K., Mihara, H., *Protein-detecting microarrays: Current accomplishments and requirements*, ChemBioChem, **2005**, 6, 782 - 799.

- [152] Butler, J., *Enzyme-linked immunosorbent assay*, J. Immunoassay, **2000**, 21, 165 - 209.
- [153] Takeshi, S., Cantor, C., *Cooperative biotin binding by streptavidin*, J. Biol. Chem., **1990**, 265, 3369 - 3373.
- [154] Wojeciechowski, J., Danley, D., Cooper, J., Yazvenko, N., Taitt, C., *Multiplexed electrochemical detection of yersinia pestis and staphylococcal enterotoxin B using antibody microarray*, Sensors, **2010**, 10, 3351 - 3362.
- [155] Senova Immunoassay Systems, *Einführung in die PolyHRP Technologie*, <http://www.senova.de/images/stories/download/einfuehrungpolyhrp.pdf>, **15.09.2011**.
- [156] Yu, F., Liu, B., Wu, T., Chi, T., Su, M., *Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of domoic acid in shellfish*, J. Agri. Food Chem., **2004**, 52, 5334 - 5339.
- [157] Kreuzer, M., O'Sullivan C., Guibalt, G., *Development of an ultrasensitive immunoassay for rapid measurement of okadaic acid and its isomers*, Anal. Chem., **1999**, 71, 4198 - 4202.
- [158] Chu, F., Hsu, K., Huang, X., Barrett, R., Allison, C., *Screening of paralytic shellfish poisoning toxins in naturally occurring samples with three different direct competitive enzyme-linked immunosorbent assays*, J. Agric. Food Chem., **1996**, 44, 4043 - 4047.
- [159] Huang, X., Hsu, K., Chu, F., *Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin and neosaxitoxin*, J. Agri. Food Chem., **1996**, 44, 1029 - 1035.
- [160] Abraxis LLC, *Algal toxins*, <http://www.abraxiskits.com/productByCat.php?catId=36>, **04.03.2013**.
- [161] R-Biopharm, *RIDASCREEN®FAST PSP SC*, http://www.r-biopharm.com/product_site.php?product_id=1356&product_class_one=UmVzaWR1ZXNM=&product_class_two=UGh5Y290b3hpbnM=&product_class_three=U2F4aXRveGluIChQU1Ap&product_class_four=&product_range=Food%20and%20Feed%20Analysis&, **04.03.2013**.

- [162] FAO/WHO/IOC, *Report of the joint FAO/IOC/WHO ad hoc expert consultation on biotoxins in bivalve molluscs, 2004*,
ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/biotoxin_report_en.pdf, **04.03.2013**.
- [163] O'Neill, S., Moffat, C., *A review of protein phosphatase inhibition assays and other available methods for the detection of diarrhetic shellfish toxins*,
<http://www.scotland.gov.uk/Uploads/Documents/0200INT.pdf>, **04.03.2013**.
- [164] ERFA Biotech, *ELISA kit for quantification of okadaic acid*,
http://www.erfabitech.com/biotechmerged_pr.htm, **04.03.2013**.
- [165] Morton, S., Tindall, D., *Determination of okadaic acid content of dinoflagellate cells: A comparison of the HPLC-fluorescent method and two monoclonal antibody ELISA test kits*, *Toxicon*, **1996**, 34, 947 - 954.
- [166] Pohanka, M., Skladal, P., *Electrochemical biosensors – principles and applications*, *J. Appl. Biomed.*, **2008**, 6, 57 - 64.
- [167] Gründler, P., *Chemische Sensoren*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, **2004**.
- [168] Carter, R., Poli, M., Pesevento, M., Sibley, D., Lubrano, G., Guilbault, G., *Immunochemical biosensors for detection of saxitoxin and brevetoxin*, *Immunomethods*, **1993**, 3, 128 - 133.
- [169] Micheli, L., Radoi, A., Guarrina, R., Massaud, R., Bala, C., Moscone, D., Palleschi, G., *Disposable immunosensor for the determination of domoic acid in shellfish*, *Biosens. Bioelectron.*, **2004**, 20, 190-196.
- [170] Kreuzer, M., Pravda, M., O'Sullivan, C., Guilbault, G., *Novel electrochemical immunosensors for seafood toxin analysis*, *Toxicon*, **2002**, 40, 1267 - 1274.
- [171] Campas, M., de la Iglesia, P., Le Berre, M., Kane, M., Diogene, J., Marty, J., *Enzymatic recycling-based amperometric immunosensor for the ultrasensitive detection of okadaic acid in shellfish*, *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 24, 716 - 722.

- [172] Hayat, A., Barthelmebs, L., Marty, J., *Enzyme-linked immunosensor based on super paramagnetic nanobeads for easy and rapid detection of okadaic acid*, Anal. Chim. Acta, **2011**, 690, 248 - 252.
- [173] Tang, A., Pravda, M., Guibault, G., Piletsky, S., Turner, A., *Immunosensor for okadaic acid using quartz crystal microbalance*, Anal. Chim. Acta, **2002**, 471, 33 - 40.
- [174] Kessler, R., *Prozessanalytik*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2006**.
- [175] Hering, E., Schönfelder, G., *Sensoren in Wissenschaft und Technik: Funktionsweise und Einsatzgebiete*, Vieweg Teubner Verlag, Wiesbaden, **2012**.
- [176] Yu, Q. M., Chen, S. F., Taylor, A. D., Homola, J., Hock, B., Jiang, S. Y., *Detection of low-molecular-weight domoic acid using surface plasmon resonance sensor*, Sens. Actuators B Chem., **2005**, 107, 193-201.
- [177] Llamas, N. M., Stewart, L., Fodey, T., Higgins, H. C., Velasco, M. L. R., Botana, L. M., Elliott, C. T., *Development of a novel immunobiosensor method for the rapid detection of okadaic acid contamination in shellfish extracts*, Anal. Bioanal. Chem., **2007**, 389, 581-587.
- [178] Stewart, L. D., Hess, P., Connolly, L., Elliott, C. T., *Development and single-laboratory validation of a pseudofunctional biosensor immunoassay for the detection of the okadaic acid group of toxins*, Anal. Chem., **2009**, 81, 10208-10214.
- [179] Campbell, K., Rawn, D., Niedzwiadek, B., Elliott, C., *Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin binders for optical biosensor technology: Problems and possibilities for the future: A review*, Food Addit. Contam., **2011**, 28, 711 - 725.
- [180] Yakes, B., Prezioso, S., Haughey, S., Campbell, K., Elliott, C., DeGrasse, S., *An improved immunoassay for detection of saxitoxin by surface plasmon resonance biosensors*, Sens. Actuators B, **2011**, 156, 805 - 811.
- [181] Campbell, K., Haughey, S., van den Top, H., van Egmond, H., Vilarino, N., Botana, L., Elliott, C., *Single laboratory validation of a surface plasmon resonance biosensor*

-
- screening method for paralytic shellfish poisoning toxins*, Anal. Chem., **2010**, 82, 2977 - 2988.
- [182] Fonfria, E., Vilarino, N., Campbell, K., Elliott, C., Haughey, S., Ben-Gigirey, B., Vieites, J., Kawatsu, K., Botana, L., *Paralytic shellfish poisoning detection by surface plasmon resonance-based biosensors in shellfish matrixes*, Anal. Chem., **2007**, 79, 6303 - 6311.
- [183] Campbell, K., Huet, A., Charlier, C., Higgins, C., Delahaut, P., Elliot, C., *Comparison of ELISA and SPR biosensor technology for the detection of paralytic shellfish poisoning*, J. Chromatogr. B, **2009**, 877, 4079 - 4089.
- [184] Lakowicz, J., *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer Science Business Media, New York, **2006**.
- [185] Esteve-Turrillas, F., Abad-Fuentes, A., *Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes*, Biosens. Bioelectron., **2013**, 41, 12 - 29.
- [186] Corr, S., Rakovich, Y., Gun'ko, Y., *Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications*, Nanoscale Res. Lett., **2008**, 3, 87 - 104.
- [187] McGrath, T., Andersson, K., Campbell, K., Fodey, T., Elliott, C., *Development of a rapid low cost fluorescent biosensor for the detection of food contaminants*, Biosens. Bioelectron., **2013**, 41, 96 - 102.
- [188] Meneely, J., Campbell, K., Greef, C., Lochhead, M., Elliott, C., *Development and validation of an ultrasensitive fluorescence planar waveguide biosensor for the detection of paralytic shellfish toxins in marine algae*, Biosens. Bioelectron., **2013**, 41, 691 - 697.
- [189] Marquette, C., Blum, L., *Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry*, Anal. Bioanal. Chem., **2006**, 385, 546 - 554.
- [190] Garcia-Campana, A., Lara, F., *Trends in the analytical applications of chemiluminescence in the liquid phase*, Anal. Bioanal. Chem., **2007**, 387, 165 - 169.

-
- [191] Marquette, C., Coulet, P., Blum L., *Semi-automated membrane based chemiluminescent immunosensor for flow injection analysis of okadaic acid in mussels*, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 398, 173 - 182.
- [192] Vilarino, N., Fonfria, E., Louza, M. Botana, L., *Use of biosensors as alternatives to current regulatory methods for marine biotoxins*, *Sensors*, **2009**, 9, 9414-9443.
- [193] Vilarino, N., Louzao, M., Vieytes, M., Botana, L., *Biological methods for marine toxin detection*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 397, 1673 - 1681.
- [194] Campbell, K., McGrath, T., Sjolander, S., Hanson, T., Tidare, M., Jansson, O., Moberg, A., Mooney, M., Elliott, C., Buijs, J., *Use of a novel micro-fluidic device to create arrays for multiplex analysis of large and small molecular weight compounds by surface plasmon resonance*, *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 26, 3029 - 3036.
- [195] Barbulovic-Nad, I., Lucente, M., Sun, Y., Zhang, M., Wheeler, A., Bussmann, M., *Bio-Microarray fabrication techniques: A review*, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **2006**, 26, 237 - 259.
- [196] Kusnezow, W., Jacob, A., Walijew, A., Diehl, F., Hoheisel, J. D., *Antibody microarrays: An evaluation of production parameters*, *Proteomics*, **2003**, 3, 254 - 264.
- [197] Grainger, D., Greef, C., Gong, P., Lochhead, M., *Current microarray surface chemistries*, *Meth. Mol. Biol.*, **2007**, 381, 37 - 57.
- [198] Seidel, M., Niessner, R., *Automated analytical microarrays: A critical review*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391, 1521 - 1544.
- [199] Sashwati, R., Sen, C., *cDNA Microarray Screening in Food Safety*, *Toxicology*, **2006**, 221, 128 - 133.
- [200] Ekins, R., *Ligand assays: From electrophoresis to miniaturized microarrays*, *Clin. Chem.*, **1998**, 44, 2015 - 2030.

-
- [201] Rodriguez-Mozaz, S., Lopez del Alda, J., Barcelo, D., *Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring*, Anal. Bioanal. Chem., **2006**, 386, 1025 - 1041.
- [202] Kloth, K., Rye-Johnsen, M., Didier, A., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Niessner, R., Seidel, M., *A regenerable immuno chip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk*, Analyst, **2009**, 134, 1433 - 1439.
- [203] Wutz, K., Niessner, R., Seidel, M., *Simultaneous determination of four different antibiotic residues in honey by chemiluminescence multianalyte chip immunoassays*, Microchim. Acta, **2011**, 173, 1-9.
- [204] European Commission, *Verordnung (EG) Nr. 2002/657*, Off. J. Eur. Union L 221, **2002**, 8 - 36.
- [205] Chemgapedia, *Lerneinheit: Begriffe der Analytik*, <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/13/vlu/analytik/begriffe/begriffe.vlu.html>, **06.08.2013**.
- [206] Kalb, S., Barr, J., *Mass spectrometric detection of ricin and its activity in food and clinical samples*, Anal. Chem., **2009**, 81, 2037 - 2042.
- [207] Kull, S., Pauly, D., Störmann, B., Kirchner, S., Stämmler, M., Dorner, M., Lasch, P., Naumann, D., Dorner, B., *Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*, Anal. Chem., **2010**, 82, 2916 - 2924.
- [208] Sospedra, I., Soler, C., Manes, J., Sorina, J., *Rapid whole protein quantification of Staphylococcal enterotoxins A and B by liquid chromatography/mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **2012**, 1238, 54 - 59.
- [209] Kientz, C., Hulst, A., Wils, E., *Determination of Staphylococcal enterotoxin B by on-line (micro) liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, **1997**, 757, 51 - 64.

- [210] McGrath, T., Elliott, C., Fodey, T., *Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food*, Anal. Bioanal. Chem., **2012**, 403, 75 - 92.
- [211] Ler, S., Lee, F., Gopalakrishnakone, P., *Trends in the detection of warfare agents: Detection methods for ricin, Staphylococcal enterotoxin B and T-2 toxin*, J. Chromatogr. A, **2006**, 1133, 1 - 12.
- [212] Gooding, J., *Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends*, Anal. Chim. Acta, **2006**, 559, 137 - 151.
- [213] Lubelli, C., Chatgililoglu, A., Bolognesi, A., Strocchi, P., Colombatti, M., Stirpe, F., *Detection of ricin and other ribosome-inactivating proteins by an immuno-polymerase chain reaction assay*, Anal. Biochem., **2006**, 355, 102 - 109.
- [214] Guo, J., Shen, B., Feng, J., Sun, Y., Yu, M., Hu, M., *A novel neutralizing monoclonal antibody against both ricin toxin A and ricin toxin B, and application of a rapid sandwich enzyme-linked immunosorbent assay*, Hybridoma, **2006**, 25.
- [215] Haes, A., Terray, A., Collins, G., *Bead-assisted displacement immunoassay for Staphylococcal enterotoxin B on a microchip*, Anal. Chem., **2006**, 78, 8412 - 8420.
- [216] Goldman, E., Clapp, A., Anderson, G., Uyeda, T., Mauro, M., Medintz, I., Mattoussi, H., *Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents*, Anal. Chem., **2004**, 76, 684 - 688.
- [217] Lian, W., Wu, D., Lim, D., Jin, S., *Sensitive detection of multiplex toxins using antibody microarrays*, Anal. Biochem., **2010**, 401, 271 - 279.
- [218] Huelseweh, B., Ehricht, R., Marschall, H., *A simple and rapid protein array based method for the simultaneous detection of biowarfare agents*, Proteomics, **2006**, 6, 2972 - 2981.
- [219] Luminex, *xMAP Technology*,
<http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/>, **08.03.2013**.

- [220] Garber, E., Venkateswaran, K., O'Brien, T., *Simultaneous multiplex detection and confirmation of the proteinaceous toxins abrin, ricin, botulinum toxins, and Staphylococcus enterotoxins A, B, and C in food*, J. Agric. Food Chem., **2010**, 58, 6600 - 6607.
- [221] Wang, J., Yang, Y., Zhou, L., Wang, J., Jiang, Y., Hu, K., Sun, X., Hou, Y., Zhu, Z., Guo, Z., Ding, Y., Yang, R., *Simultaneous detection of five biothreat agents in powder samples by multiplexed suspension array*, Immunopharm. Immunot., **2009**, 31, 417 - 427.
- [222] O'Brien, T., Johnson, L., Aldrich, J., Allen, S., Liang, L., Plummer, A., Krak, S., Boiarski, A., *The development of immunoassays to four biological threat agents in a bidiffractive grating biosensor*, Biosens. Bioelectron., **2000**, 14, 815 - 828.
- [223] Anderson, G., King, K., Gaffney, K., Johnson, L., *Multi-analyte interrogation using the fiber optic biosensor*, Biosens. Bioelectron., **2000**, 14, 771 - 777.
- [224] Ligler, F., Taitt, C., Shriver-Lake, L., Sapsford, K., Shubin, Y., Golden, J., *Array biosensor for detection of toxins*, Anal. Bioanal. Chem., **2003**, 377, 469 - 477.
- [225] Taitt, C., Shriver-Lake, L., Ngundi, M., Ligler, F., *Array biosensor for toxin detection: Continued advances*, Sensors, **2008**, 8, 8361 - 8377.
- [226] Ligler, F., Sapsford, K., Golden, J., Shriver-Lake, L., Taitt, C., Dyer, M., Barone, S., Myatt, C., *The array biosensor: Portable, automated systems*, Anal. Sci., **2007**, 23, 5 - 10.
- [227] Delehanty, J., Ligler, F., *A microarray immunoassay for simultaneous detection of proteins and bacteria*, Anal. Chem., **2002**, 74, 5681 - 5687.
- [228] Weingart, O., Gao, H., Crevoisier, F., Heitger, F., Avondet, M., Sigrist, H., *A bioanalytical platform for simultaneous detection and quantification of biological toxins*, Sensors, **2012**, 12, 2324 - 2339.

- [229] Rubina, A., Dyukova, V., Dementieva, E., Stomakhin, A., Nesmeyanov, V., Grishin, E., Zasedatelev, A., *Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips*, *Anal. Biochem.*, **2005**, 340, 317 - 329.
- [230] Wolter, A., Niessner, R., Seidel, M., *Preparation and characterization of functional poly(ethylene glycol) surfaces for the use of antibody microarrays*, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 4529 - 4537.
- [231] Oswald, S., Karsunke, X. Y. Z., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Niessner, R., Knopp, D., *Automated regenerable microarray-based immunoassay for rapid parallel quantification of mycotoxins in cereals*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, 405, 6405 - 6415.
- [232] Zeck, A., Weller, M., Bursill, D., Niessner, R., *Generic microcystin immunoassay based on monoclonal antibodies against Adda*, *Analyst*, **2001**, 126, 2002 - 2007.
- [233] Wolter, A., Niessner, R., Seidel, M., *Detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella typhimurium, and Legionella pneumophila in water using a flow-through chemiluminescence microarray readout system*, *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 5854 - 5863.
- [234] Ott, S., Niessner, R., Seidel, M., *Preparation of epoxy-based macroporous monolithic columns for the fast and efficient immunofiltration of Staphylococcus aureus*, *J. Sep. Sci.*, **2011**, 34, 2181 - 2192.
- [235] Angenendt, P., Glöcker, J., Sobek, J., Lehrach, H., Cahill, D., *Next generation of protein microarray support materials: Evaluation for protein and antibody microarray applications*, *J. Chromatogr.*, **2003**, 1009, 97 - 104.
- [236] Piehler, J., Brecht, A., Geckeler, K., Gauglitz, G., *Surface modification for direct immunoprobes*, *Biosens. Bioelectron.*, **1996**, 11, 579 - 590.
- [237] Piehler, J., Brecht, A., Valiokas, R., Liedberg, B., Gauglitz, G., *A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces*, *Biosens. Bioelectron.*, **2000**, 15, 473 - 481.

-
- [238] Kannan, B., Castelino, K., Chen, F., Majumdar, A., *Lithographic techniques and surface chemistries for the fabrication of PEG-passivated protein microarrays*, Biosens. Bioelectron., **2006**, 21, 1960 - 1967.
- [239] Haab, B., Dunham, M., O Brown, P., *Protein microarrays for highly parallel detection and quantification of specific proteins and antibodies in complex solutions*, Genome Biol., **2001**, 2, 1 - 13.
- [240] Zhang, J., Zhou, X., *Novel 3-dimensional dendrimer platform for glycolipid microarray*, Biosens. Bioelectron., **2011**, 28, 355 - 361.
- [241] Haake, H., *Monitoring von Festphasensynthesen und biospezifische Detektion in der HPLC mit reflektometrischer Interferenzspektroskopie*, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, **2000**.
- [242] Micheli, L., Di Stefano, S., Moscone, D., Palleschi, G., Marini, S., Coletta, M., Draisci, R., delli Quadri, F., *Production of antibodies and development of highly sensitive formats of enzyme immunoassay for saxitoxin analysis*, Anal. Bioanal. Chem., **2002**, 373, 678 - 684.
- [243] Saucedo-Friebe, J., Karsunke, X., Vazac, S., Biselli, S., Niessner, R., Knopp, D., *Regenerable immuno-biochip for screening ochratoxin A in green coffee extract using an automated microarray chip reader with chemiluminescence detection*, Anal. Chim. Acta, **2011**, 689, 234 - 242.
- [244] Robillot, C., Kineavy, D., Burnell, J., Llewellyn, L., *Synthesis of bifunctional saxitoxin analogues by biotinylation*, Toxicon, **2009**, 53, 460 - 465.
- [245] Ghazarossian, V., Schantz, E., Schnoes, H., Strong, F., *A biologically active acid hydrolysis product of saxitoxin*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **1976**, 68, 776 - 780.
- [246] Petz, M., *Recent applications of surface resonance biosensors for analyzing residues and contaminants in food*, Monatsh. Chem., **2009**, 140, 953 - 964.

- [247] Rebodera, A., Lago, J., Chapela, M., Vieites, J., Botana, L., Alfonso, A., Cabado, A., *Decrease of marine toxin content in bivalves by industrial processes*, *Toxicon*, **2010**, 55, 235 - 243.
- [248] Hegde, R., Podder, S., *Studies on the variants of the protein toxins ricin and abrin*, *Eur. J. Biochem.*, **1992**, 204, 155 - 164.

Anhang

Messprogramm: Phycotoxine	Messprotokoll: Proteotoxine
<p>1; 6L6Y1A2; 4P2S500D300,000; 5; 6L4I; 6L5Y1A6; 6L7B; 6L6Y1A1; 4P2S100D200,000; 5; 6L7O; 4P2S60D500,000; 4P1S60D500,000; 5; 6L7B; 5; 8; 6L6Y1A3; 3P2S250P1000,000; 5; 6L6Y1A2; 4P2S250D1000,000; 5; 9L3; 5; 6L6Y1A3; 3P2S250P1000,000; 5; 6L6Y1A1; 4P2S2D1000,000; 5; 6L2Y1A3; 3P4S1500P2000,000; 5; 6L5Y1A1; 6L2Y1A5; 4P4S500D2000,000; 5; 6L5Y1A4; 4P0S100D200,000; 4P0S5D800,000; 5; 6L2Y1A3; 3P4S1500P4000,000; 5; 6L5Y1A1;</p>	<p>1; 6L4I; 6L5Y1A6; 6L7B; 6L6Y1A1; 4P2S100D300,000; 5; 6L7O; 4P2S10D700,000; 4P1S10D700,000; 5; 6L7B; 5; 8; 6L6Y1A3; 3P2S250P1000,000; 5; 6L6Y1A2; 4P2S250D1000,000; 5; 9L3; 5; 6L6Y1A3; 3P2S250P1000,000; 5; 6L6Y1A1; 5; 8; 4P2S10D50,000; 5; 7W10000; 5; 9L20; 5; 6L2Y1A3; 3P4S1500P2000,000; 5; 6L5Y1A1; 6L2Y1A5; 4P4S500D2000,000; 5; 6L5Y1A4; 4P0S100D200,000; 4P0S5D800,000; 5; 6L2Y1A3;</p>

6L2Y1A5; 4P4S500D2000,000; 5; 6L3Y1A3; 3P3S300P250,000; 5; 6L3Y1A4; 3P3S300P250,000; 5; 6L5Y1A2; 6L3Y1A2; 4P3S10D500,000; 5; 6L4O; 5; 0KeinPfad%F%2%60000; 5; 6L4I; 6L5Y1A1; 5; 4P4S500D2000,000; 5; 8; 6L6Y1A3; 3P2S250P1000,000; 5; 6L6Y1A2; 4P2S250D1000,000; 5; 9L2; 5; 6L5Y1A6; 8; 6L6Y1A3; 3P2S250P1000,000; 5; 6L6Y1A1; 4P2S250D1000,000; 5; 9L3; 5; 6L5Y1A1; 6L6Y1A3; 6L2Y1A4; 3P4S1000P4000,000; 3P2S250P1000,000; 5; 6L2Y1A5; 4P4S10D1000,000; 5; 8;	3P4S1500P4000,000; 5; 6L5Y1A1; 6L2Y1A5; 4P4S500D2000,000; 5; 6L3Y1A3; 5; 3P3S300P250,000; 5; 6L3Y1A4; 3P3S300P250,000; 5; 6L5Y1A2; 6L3Y1A2; 4P3S10D500,000; 5; 6L4O; 5; 0KeinPfad%F%2%60000; 5; 6L4I; 6L5Y1A1; 5; 4P4S500D2000,000; 5; 8; 6L6Y1A3; 3P2S250P1000,000; 5; 6L6Y1A2; 4P2S250D1000,000; 5; 9L2; 5; 6L5Y1A6; 8; 6L6Y1A3; 3P2S250P1000,000; 5; 6L6Y1A1; 4P2S250D1000,000; 5; 9L3; 5; 6L6Y1A3; 3P2S250P1000,000; 5; 6L6Y1A1; 4P2S250D1000,000; 5; 9L3; 5; 6L6Y1A3; 3P2S250P1000,000; 5; 6L5Y1A1; 6L2Y1A3; 3P4S1500P2000,000;
--	--

6L2Y1A5; 5; 8; 4P4S100D100,000; 3P4S100P100,000; 9L5; 5; 4P4S250D600,000; 9L5; 5; 6L2Y1A3; 3P4S1500P2000,000; 5; 6L2Y1A5; 4P4S500D2000,000; 5; MENUE Initialisieren Ventil 6 auf Position 2 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 2 Dispense: 300 ul Speed: 500 ul/s ReadyCheck Ventil 4 auf Position I Ventil 5 auf Position 6 im Uhrzeigersinn Ventil 7 auf Position B Ventil 6 auf Position 1 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 2 Dispense: 200 ul Speed: 100 ul/s ReadyCheck Ventil 7 auf Position O DispensePump Pump: 2 Dispense: 500 ul Speed: 60 ul/s DispensePump Pump: 1 Dispense: 500 ul Speed: 60 ul/s ReadyCheck Ventil 7 auf Position B ReadyCheck Do Ventil 6 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 2 Pickup: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Ventil 6 auf Position 2 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 2 Dispense: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Loop for 3times ReadyCheck Ventil 6 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 2 Pickup: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Ventil 6 auf Position 1 im Uhrzeigersinn ReadyCheck Do DispensePump Pump: 2 Dispense: 50 ul Speed: 10 ul/s ReadyCheck Wait for 10000 ms ReadyCheck Loop for 20times ReadyCheck Ventil 2 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 4 Pickup: 2000 ul Speed: 1500 ul/s ReadyCheck	5; 6L2Y1A5; 4P4S500D2000,000; 5; MENUE Initialisieren Ventil 4 auf Position I Ventil 5 auf Position 6 im Uhrzeigersinn Ventil 7 auf Position B Ventil 6 auf Position 1 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 2 Dispense: 300 ul Speed: 100 ul/s ReadyCheck Ventil 7 auf Position O DispensePump Pump: 2 Dispense: 700 ul Speed: 10 ul/s DispensePump Pump: 1 Dispense: 700 ul Speed: 10 ul/s ReadyCheck Ventil 7 auf Position B ReadyCheck Do Ventil 6 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 2 Pickup: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Ventil 6 auf Position 2 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 2 Dispense: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Loop for 3times ReadyCheck Ventil 6 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 2 Pickup: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Ventil 6 auf Position 1 im Uhrzeigersinn ReadyCheck Do DispensePump Pump: 2 Dispense: 50 ul Speed: 10 ul/s ReadyCheck Wait for 10000 ms ReadyCheck Loop for 20times ReadyCheck Ventil 2 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 4 Pickup: 2000 ul Speed: 1500 ul/s ReadyCheck
---	---

<p>LoadPump Pump: 2 Pickup: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Ventil 6 auf Position 1 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 2 Dispense: 1000 ul Speed: 2 ul/s ReadyCheck Ventil 2 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 4 Pickup: 2000 ul Speed: 1500 ul/s ReadyCheck Ventil 5 auf Position 1 im Uhrzeigersinn Ventil 2 auf Position 5 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 4 Dispense: 2000 ul Speed: 500 ul/s ReadyCheck Ventil 5 auf Position 4 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 0 Dispense: 200 ul Speed: 100 ul/s DispensePump Pump: 0 Dispense: 800 ul Speed: 5 ul/s ReadyCheck Ventil 2 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 4 Pickup: 4000 ul Speed: 1500 ul/s ReadyCheck Ventil 5 auf Position 1 im Uhrzeigersinn Ventil 2 auf Position 5 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 4 Dispense: 2000 ul Speed: 500 ul/s ReadyCheck Ventil 3 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 3 Pickup: 250 ul Speed: 300 ul/s ReadyCheck Ventil 3 auf Position 4 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 3 Pickup: 250 ul Speed: 300 ul/s ReadyCheck Ventil 3 auf Position 4 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 3 Pickup: 250 ul Speed: 300 ul/s ReadyCheck Ventil 5 auf Position 2 im Uhrzeigersinn Ventil 3 auf Position 2 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 3 Dispense: 500 ul Speed: 10 ul/s ReadyCheck Ventil 4 auf Position O ReadyCheck Take Photo with: 2 x 2 and 60000 ms ReadyCheck Ventil 4 auf Position I Ventil 5 auf Position 1 im Uhrzeigersinn ReadyCheck</p>	<p>Ventil 5 auf Position 1 im Uhrzeigersinn Ventil 2 auf Position 5 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 4 Dispense: 2000 ul Speed: 500 ul/s ReadyCheck Ventil 5 auf Position 4 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 0 Dispense: 200 ul Speed: 100 ul/s DispensePump Pump: 0 Dispense: 800 ul Speed: 5 ul/s ReadyCheck Ventil 2 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 4 Pickup: 4000 ul Speed: 1500 ul/s ReadyCheck Ventil 5 auf Position 1 im Uhrzeigersinn Ventil 2 auf Position 5 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 4 Dispense: 2000 ul Speed: 500 ul/s ReadyCheck Ventil 3 auf Position 3 im Uhrzeigersinn ReadyCheck LoadPump Pump: 3 Pickup: 250 ul Speed: 300 ul/s ReadyCheck Ventil 3 auf Position 4 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 3 Pickup: 250 ul Speed: 300 ul/s ReadyCheck Ventil 5 auf Position 2 im Uhrzeigersinn Ventil 3 auf Position 2 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 3 Dispense: 500 ul Speed: 10 ul/s ReadyCheck Ventil 4 auf Position O ReadyCheck Take Photo with: 2 x 2 and 60000 ms ReadyCheck Ventil 4 auf Position I Ventil 5 auf Position 1 im Uhrzeigersinn ReadyCheck DispensePump Pump: 4 Dispense: 2000 ul Speed: 500 ul/s ReadyCheck Do Ventil 6 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 2 Pickup: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Ventil 6 auf Position 2 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 2 Dispense: 1000 ul</p>
---	---

DispensePump Pump: 4 Dispense: 2000 ul Speed: 500 ul/s ReadyCheck Do Ventil 6 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 2 Pickup: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Ventil 6 auf Position 2 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 2 Dispense: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Loop for 2times ReadyCheck Ventil 5 auf Position 6 im Uhrzeigersinn Do Ventil 6 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 2 Pickup: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Ventil 6 auf Position 1 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 2 Dispense: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Loop for 3times ReadyCheck Ventil 5 auf Position 1 im Uhrzeigersinn Ventil 6 auf Position 3 im Uhrzeigersinn Ventil 2 auf Position 4 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 4 Pickup: 4000 ul Speed: 1000 ul/s LoadPump Pump: 2 Pickup: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Ventil 2 auf Position 5 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 4 Dispense: 1000 ul Speed: 10 ul/s ReadyCheck Do Ventil 2 auf Position 5 im Uhrzeigersinn ReadyCheck Do DispensePump Pump: 4 Dispense: 100 ul Speed: 100 ul/s LoadPump Pump: 4 Pickup: 100 ul Speed: 100 ul/s Loop for 5times ReadyCheck DispensePump Pump: 4 Dispense: 600 ul Speed: 250 ul/s Loop for 5times	Speed: 250 ul/s ReadyCheck Loop for 2times ReadyCheck Ventil 5 auf Position 6 im Uhrzeigersinn Do Ventil 6 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 2 Pickup: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Ventil 6 auf Position 1 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 2 Dispense: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Loop for 3times ReadyCheck Ventil 6 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 2 Pickup: 1000 ul Speed: 250 ul/s ReadyCheck Ventil 5 auf Position 1 im Uhrzeigersinn Ventil 2 auf Position 3 im Uhrzeigersinn LoadPump Pump: 4 Pickup: 2000 ul Speed: 1500 ul/s ReadyCheck Ventil 2 auf Position 5 im Uhrzeigersinn DispensePump Pump: 4 Dispense: 2000 ul Speed: 500 ul/s ReadyCheck ENDFILE
--	--

ReadyCheck
Ventil 2 auf Position 3 im Uhrzeigersinn
LoadPump Pump: 4 Pickup: 2000 ul Speed:
1500 ul/s
ReadyCheck
Ventil 2 auf Position 5 im Uhrzeigersinn
DispensePump Pump: 4 Dispense: 2000 ul
Speed: 500 ul/s
ReadyCheck

ENDFILE
