

Inhalt

1	MOTIVATION UND ZIELSETZUNG	1
2	THEORIE	5
2.1	Physikalische und physikochemische Grundlagen.....	5
2.1.1	Brechungsindex.....	5
2.1.2	Lichtbrechung und -reflexion	6
2.1.3	Reflektivität und Transmission.....	7
2.1.4	Totalreflexion und evaneszentes Feld	7
2.1.5	Interferenz an dünnen Schichten.....	9
2.1.6	Lumineszenz	10
2.2	Messmethoden.....	13
2.2.1	Reflektometrische Interferenzspektroskopie.....	13
2.2.2	Totale Interne Reflexion-Fluoreszenz.....	14
2.2.3	Oberflächencharakterisierung	15
2.3	Biochemische und bioanalytische Grundlagen	20
2.3.1	Proteine	20
2.3.2	Antikörper	22
2.3.3	Antigene	25
2.3.4	Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen.....	26
2.3.5	Untersuchte Analyte	26
2.3.6	Immunoassay Testformate	28
2.4	Therapeutisches Drug Monitoring (TDM).....	34
2.4.1	Allgemeines	34
2.4.2	Trizyklische Antidepressiva	36
3	MATERIAL UND METHODEN.....	37
3.1	Verbrauchsmaterialien	37
3.1.1	Chemikalien.....	37
3.1.2	Proteine	38
3.1.3	Pufferaustausch bei Proteinlösungen	40
3.1.4	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	41
3.1.5	Lösungen.....	42
3.1.6	Transducer	43
3.2	Geräte	45
3.2.1	RIfS	45
3.2.2	TIRF	46
3.2.3	Weitere Geräte	48
3.3	Datenauswertung.....	50
3.3.1	Auswertung RIfS.....	50
3.3.2	Auswertung TIRF.....	54

4	OBERFLÄCHENMODIFIZIERUNG	57
4.1	Vorbereitende Funktionalisierungsschritte	57
4.1.1	Reinigung und Aktivierung der Glasoberfläche	57
4.1.2	Silanisierung.....	58
4.1.3	Beschichtung mit einem Biopolymer	59
4.1.4	Umfunktionalisierung mit Glutarsäureanhydrid.....	62
4.2	Carbodiimid-vermittelte Immobilisierung	63
4.2.1	Kovalente Immobilisierung kleiner organischer Moleküle.....	63
4.2.2	Kovalente Immobilisierung von Proteinen	64
4.3	Protein-Immobilisierung mittels DMP-Linker.....	68
4.4	Immobilisierung mit kupferfreier Click-Chemie.....	69
4.4.1	Funktionalisierung der Pankreas-Lipase	69
4.4.2	Cyclooctin-funktionalisierte Oberfläche	70
4.4.3	Azid-funktionalisierte Oberfläche.....	71
4.5	Charakterisierung der modifizierten Oberflächen.....	72
4.5.1	Oberflächentopographie.....	72
4.5.2	Schwingungsspektren der organischen Schichten.....	75
4.5.3	Benetzungsfähigkeit.....	77
5	ASSAY-ENTWICKLUNG	81
5.1	Quantitativer Immunoassay für die Pankreas-Lipase.....	82
5.1.1	Experimente zum Sandwich-Assay	82
5.1.2	Online-Sandwich-Assay	87
5.1.3	Bindungshemmtest	97
5.1.4	Vergleich verschiedener poly- und monoklonaler Antikörper	100
5.1.5	Alternative Anbindung der Lipase mittels Click-Chemie	104
5.1.6	Konzentrationsabhängigkeit des Bindungssignals	106
5.1.7	Kalibrierung des Bindungshemmtest in Puffer	108
5.1.8	Markieren von a-HPL Antikörpern mit Dy-652.....	111
5.1.9	Messungen auf einem miniaturisierten TIRF-Aufbau	113
5.2	Quantitativer Immunoassay für Amitriptylin.....	117
5.2.1	Bindungshemmtest	117
5.2.2	Optimierung des Bindungssignals	119
5.2.3	Kalibrierung in Puffer.....	122
5.2.4	Kreuzreaktivitäten mit anderen TCAs.....	125
5.2.5	Inter-Transducer-Reproduzierbarkeit	127
5.2.6	Langzeitstabilität der Sensorbeschichtung	129
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	133
6.1	Ein Immunoassay für die humane Pankreas-Lipase	133
6.2	Ein Immunoassay für Amitriptylin	135

6.3	Allgemeiner Ausblick	137
7	LITERATUR	138
8	ANHANG	149
8.1	Abkürzungsverzeichnis	149
8.2	Fit-Parameter.....	151
8.2.1	HPL-Assay: Fit-Parameter für die Kalibrierfunktionen	151
8.2.2	AMT-Assay: Fit-Parameter für die Kalibrierfunktionen.....	152
8.3	Geräteeinstellungen	153
8.3.1	Rasterkraftmikroskop (AFM).....	153
8.3.2	Ramanspektrometer	153
8.4	Förderhinweis	155
8.5	Akademische Lehrer	156
8.6	Lebenslauf.....	157