

3.2 Geräte

3.2.1 RIfS

Als Weißlichtquelle wird eine Halogenlampe (10 V/20 W) verwendet. Die Lichtleitung zum Transducer in der Flusszelle erfolgt über einen optischen Y-Wellenleiter. Der Aufbau der Transducer ist in Abschnitt 3.1.6 beschrieben.

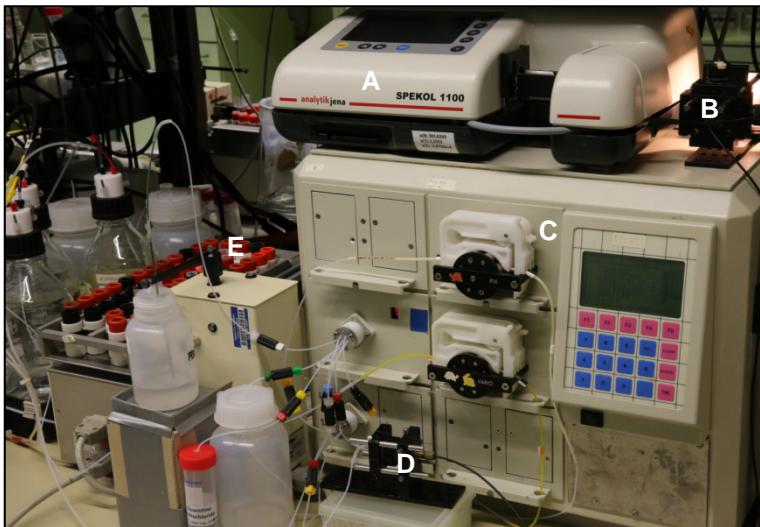


Bild 3.4 Messplatz mit RIfS-Setup: Spektrometer (A), Weißlichtquelle (B), ASIA-Fluidik (C), Flusszellenhalterung (D) und Autosampler mit Injektornadel (E)



Bild 3.5 Flusszellenhalterung aus Bild 3.4-D (A1), Flusszelle innen (A2), Flusskanal mit O-Ring (A3)

Das reflektierte Licht wird durch denselben Wellenleiter zurück zu einem Diodenarray-Spektrometer geführt. Dort wird das entstandene Interferenzspektrum detektiert. Die Flusszelle ist außerdem an das Fluidik-System ASIA (Bild 3.4-C) angeschlossen, das eine kontinuierliche Zufuhr von Reagenzien wie z. B. Puffer oder Probenlösung ermöglicht. Eine genaue Beschreibung ist

in Abschnitt 3.2.1 zu finden. Die Flusszelle weist einen schmalen Kanal auf, der durch einen kleinen O-Ring abgedichtet wird (siehe Bild 3.5-A3).

Bei dem Fluidik-System ASIA handelt es sich um eine modulare Fluidik (siehe Bild 3.6) der Firma ISMATEC SA (Glattbrugg, CH). Kontinuierlicher Fluss in der Messzelle ermöglichen zwei Peristaltik-Pumpen. Die eine Pumpe (Fixpumpe) füllt die Probenschleife mit konstanter Geschwindigkeit. Dabei gibt das 6-Wege-Ventil vor, welche Lösung aufgesaugt wird. Die Geschwindigkeit der anderen Pumpe (Variopumpe) kann variabel eingestellt werden und mit ihr wird Puffer oder der Inhalt der Probenschleife zur Flusszelle transportiert. Das Injektionsventil schaltet dabei zwischen „Load“ und „Inject“, je nachdem ob die Probenschleife gefüllt oder entleert werden soll.

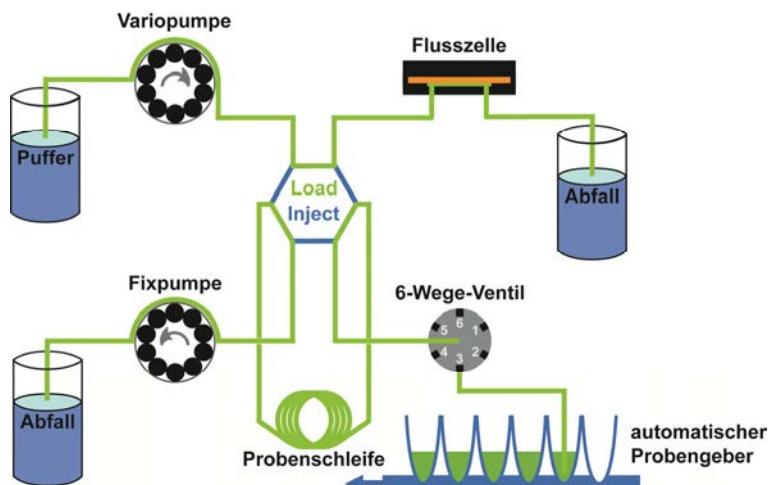


Bild 3.6 Schematischer Aufbau der ASIA-Fluidik aus Bild 3.4-C

3.2.2 TIRF

Der Messaufbau (Bild 3.7-A) besteht aus dem Dioidenlaser OBIS LX 640-40 (640 nm), der mit einer Leistung von 15 mW betrieben wird, und einem ESELog USB Detektor, der die emittierte Fluoreszenz bei 680 nm an den hinteren Reflexionspunkten senkrecht zur Glasoberfläche detektiert (siehe Bild 3.7-B1/B2). Der Glastransducer schließt die Flusszelle aus PMMA ab (Bild 3.7-B3), durch die Puffer, Proben- und Regenerationslösungen über die beschichtete Transducer-Oberfläche gepumpt werden können. Die Fluidik (Bild 3.7-B4) besteht neben der Flusszelle aus folgenden Komponenten der Firma Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, CH): eine 500 μ L fassenden Spritzenpumpe (PSD/3 mini) zusammen mit einem 8-Wege-Ventil (MVPmini). Es wird im „Stopped-Flow“-Modus (bei gestoppter Pumpe)

gemessen. Alle verwendeten Komponenten des TIRF-Aufbaus sind klein gehalten, könnten aber auch noch weiter miniaturisiert werden. Entsprechende Bauteile werden in industrieller Produktion schon verwendet.

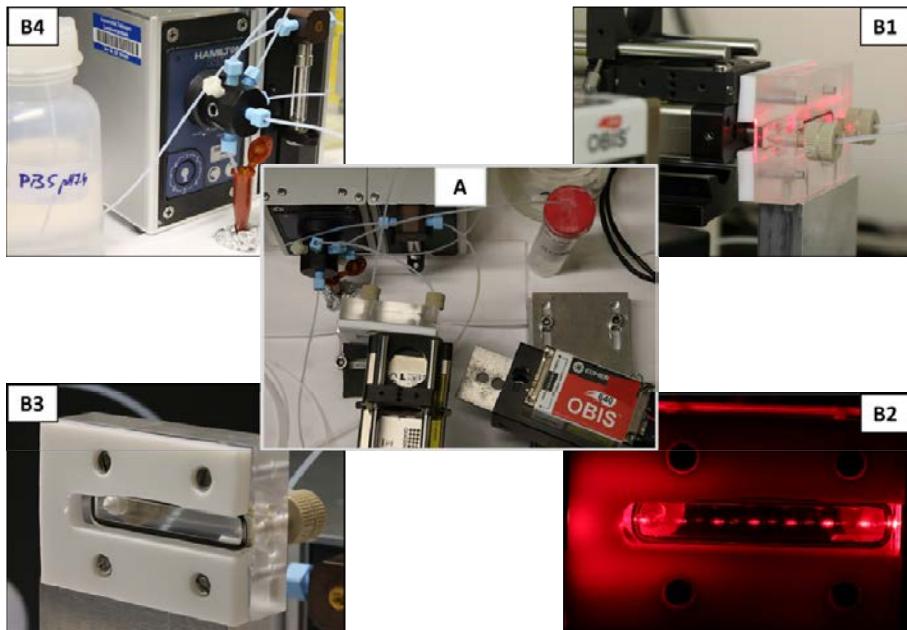


Bild 3.7 Bilder des TIRF-Messaufbaus: (A) Übersicht über den Messaufbau mit Fluidik, Laser und Detektor; (B4) Fluidik-System aus Spritzenpumpe und 8-Wege-Ventil; (B1) Anordnung Laser und Detektor zur Flusszelle; (B3) Flusszelle aus PMMA, mit einem O-Ring zur Abdichtung; (B2) Reflexionspunkte des Laserstrahls auf der Vorder- und Rückseite des Transducers

Bei dem hier vorgestellten Messaufbau wird ein Laser mit roter Wellenlänge (640 nm) verwendet. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff wurde entsprechend dazu ausgewählt (siehe Abschnitt 3.1.4). Einige Serumkomponenten können mit Anregungswellenlängen im Bereich bis 580 nm [88-94] zur Fluoreszenz angeregt werden. Daher ist die Verwendung von Laserlicht und Fluoreszenzfarbstoffen im roten Wellenlängenbereich gerade für die Bestimmung von Biomarkern in Serum vorteilhaft. Solange die Bindungskapazität der sensiblen Oberfläche nicht deutlich reduziert wird, beeinflusst eine unspezifische Anbindung von Serumproteinen die TIRF-Messung nicht.

3.2.3 Weitere Geräte

Tabelle 3.4 Angaben zu den verwendeten Geräten

Gerät	Typ	Firma
AFM	AS-130V Scanner (JV Scanner)	Veeco, Plainview, US
Bidest-Anlage	PURELAB Classic	ELGA Labwater VWS Dtschl., Celle, D
Eismaschine	AF 80	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, US
Fluoreszenz-Detektor	ESELog USB	Qiagen Lake Constance GmbH, Stockach, D
Fluoreszenz-Spektrometer	LS 50B	Perkin-Elmer, Waltham, US
Kontaktwinkel-Messgerät	CAM 200	KSV NIMA, Espoo, FIN
Dioden-Laser	OBIS LX-640-40	Coherent Europe B.V., Utrecht, NL
Mini-Fuge	Millifuge CT10	Hitachi Koki Co. Ltd., Tokyo, JPN
pH-Meter	CG843	Schott AG, Mainz, D
Pipetten	Reference	Eppendorf AG, Hamburg, D
	Pos D	Rainin Instruments, LLC, Oakland, US
Raman-Spektrometer	HR800	Horiba Jobin Yvon, Bensheim, D
Diodenarray-Spektrometer	Spekol 1100	Analytik Jena AG, Jena (D)
Ultraschallbad	Sonorex Super 10P	Bandelin electronic, Berlin, D
UV/Vis-Spektrometer	Lambda 3	Perkin-Elmer, Waltham, US
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, US

3.2 Geräte

	Micro	Satorius AG, Göttingen, D
Waagen	XS 205 Dual Range	Mettler Toledo, Greifensee, CH
Zentrifuge	Hereaus Labofuge 400R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

3.3 Datenauswertung

In diesem Abschnitt wird auf die Charakteristika der RIfS- und TIRF-Daten sowie deren Auswertung eingegangen.

3.3.1 Auswertung RIfS

Bei der Detektionsmethode RIfS werden Veränderungen in der optischen Schichtdicke der obersten Sensorschicht beobachtet. Alle Prozesse bei denen sich die Schichtdicke und/oder der Brechungsindex der sensiblen Schicht verändern, können somit zeitaufgelöst verfolgt werden. Eine genaue Beschreibung von RIfS ist im Abschnitt 2.2.1 zu finden. Bei der Untersuchung von Antikörper/Antigen-Wechselwirkungen können bei einer Anbindung des Bindungspartners Bindungssignale aufgezeichnet werden. Der Verlauf der Bindungssignale hängt von der Gleichgewichtsreaktion an der Sensoroberfläche ab (siehe Bild 3.8). Diese kann kinetisch und/ oder massentransportlimitiert (Diffusionskontrolle) sein.

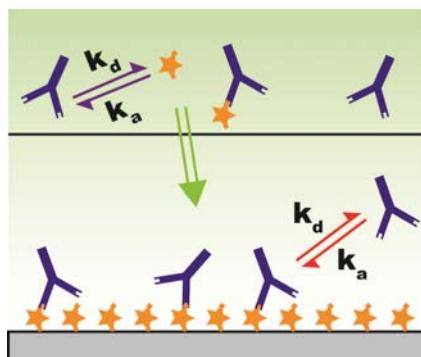


Bild 3.8 Gleichgewichtsreaktionen in der Nähe der Sensoroberfläche während des Assays unter massentransportlimitierten (Diffusion, grüner Pfeil) oder kinetisch kontrollierten (rot) Bedingungen. Beim Bindungshemmtest erfolgt zunächst eine Wechselwirkung von Ak mit freiem Ag in homogener Phase (violett)

3.3.1.1 Bindungssignale

Durch verschiedene Experimente lassen sich aus den Bindungssignalen kinetische Größen wie Assoziations-, Dissoziationskonstanten und Affinitätskonstanten des Antikörper/Antigen-Systems bestimmen. Damit die Höhe bzw. Steigung des Anbindungssignals konzentrationsabhängig ist, darf der Anbindungsprozess nur durch den Massentransport limitiert sein und keine oder nur wenig kinetische Einflüsse zeigen. Wenn diese Bedingung erfüllt ist, zeigt das zeitaufgelöste Bindungssignal einen linearen Kurvenverlauf (siehe Bild 3.9)

[70, 95-97]. Da die Auswertung der Steigung zuverlässiger als die absolute Signalhöhe des Bindungssignals ist, wird für jede Konzentration die Steigung des Bindungssignals bestimmt.

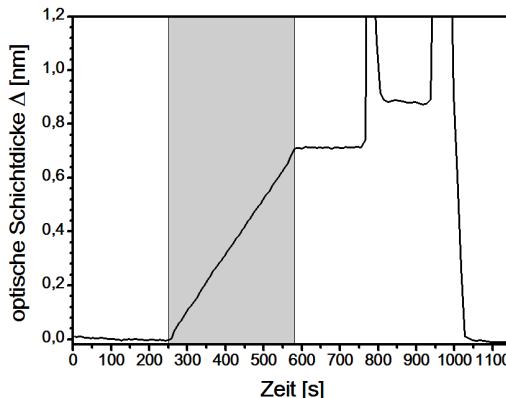


Bild 3.9 Bestimmung der Signalsteigung im linearen Bereich anhand einer Beispielmessung; Probeninjektion (grauer Bereich)

3.3.1.2 Kalibrierung

Um auch eine unbekannte Analyt-Konzentration in einer Probe bestimmen zu können, muss eine Kalibrierfunktion für den Zusammenhang zwischen Signal (z. B. Höhe oder Steigung) und Analyt-Konzentration aufgestellt werden. Im einfachsten Fall liegt ein linearer Zusammenhang vor.

Bei Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen wird der Zusammenhang komplexer. Ein IgG-Antikörper verfügt in der Regel über zwei gleichwertige Bindungsstellen bzw. Paratope. Allerdings kann sich die Affinität des zweiten Paratops nach Anbindung eines ersten Antigens erheblich ändern. Daher beobachtet man bei solchen Systemen üblicherweise einen sigmoiden Verlauf der Messdaten (siehe Bild 3.10). Um den Verlauf der Kalibrierdaten dennoch abbilden zu können, wird eine nichtlineare Regression mit einer logistischen Anpassungs-Funktion durchgeführt. Zur Bestimmung einer Kalibrierfunktion werden zunächst in einer Konzentrationsreihe verschiedene Analyt-Konzentrationen gemessen. Das Signal wird normiert und gegen die Konzentration aufgetragen. Je nachdem ob die Konzentration des Analyts direkt oder indirekt bestimmt wird, steigt das relative Signal mit der Konzentration an oder fällt ab. Einen abfallenden Kurvenverlauf beobachtet man bei einem Bindungshemmtest, da das Bindungssignal konzentrationsabhängig vom Analyt inhibiert wird und das relative Signal mit steigender Analyt-Konzentration absinkt (Bild 3.10 *links*). Dabei werden die Bindungssignale auf eine Nullmessung referenziert, bei der die Probe nur Antikörper und keinen Analyt