



universität
wien

DISSERTATION

Titel der Dissertation

Plastik-Immunglobuline zur Detektion von Bioanalyten mit Sensoren

angestrebter akademischer Grad

Doktor/in der Naturwissenschaften (Dr. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Mag. Romana Schirhagl
Matrikel-Nummer:	0301377
Dissertationsgebiet (lt. Studienblatt):	Doktoratsstudium der Naturwissenschaften (Chemie)
Betreuerin / Betreuer:	O. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Dickert

Wien, am 17. März 2009

Vorwort

Diese Arbeit entstand in der Zeit von September 2007 bis Februar 2009 in der Abteilung für Chemosensoren und optische Molekülspektroskopie unter der Leitung von O.Univ.Prof. Dr. F.L. Dickert am Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Wien, Währingerstrasse 38, 1090 Wien, Austria

Besonderer Dank geht an

Herrn O. Univ. Prof. Franz L. Dickert für die interessante Themenstellung, die wertvollen Diskussionen und Anregungen und das Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Weiters danke ich Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl und all meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe, besonders MSc. Tazeen Husain für die Zusammenarbeit und Bereitstellung der Sesamproteine, Mag. Alexandra Seifner, Mag. Paul Grillberger, Mag. Anna Findeisen und Mag. Alexander Biedermann für fruchtbare Anregungen und Diskussionen sowie Hilfsbereitschaft und ein gutes Arbeitsklima.

...und meinen Eltern, meinen Geschwistern, Großeltern und Freunden, sowie Dr. Karl-Jürgen Mann für die Unterstützung

INHALTSVERZEICHNIS:

EINLEITUNG	5
THEORIETEIL	6
CHEMOSENSOREN	6
QUARTZ CRYSTAL MICRO BALANCES (QMB)	7
ATOMIC FORCE MICROSCOPY (AFM)	8
ABWEHRMECHANISMEN DES KÖRPERS	9
DAS SPEZIFISCHE IMMUNSYSTEM	10
DIE IMMUNGLOBULINE	11
VIREN	14
DAS RHINOVIRUS	14
DAS MAUL- UND KLAUENSEUCHE VIRUS	15
DAS TABAKMOSEKIVIRUS (TMV)	16
SESAM UND SEINE BEDEUTUNG ALS ALLERGEN	16
FLUORESZENZMIKROSKOPIE	18
PRAXISTEIL	20
QCM-SENSOR BASIEREND AUF EINEM SYNTHETISCHEN IMMUNGLOBULIN	20
DAS KONZEPT	20
IMMOBILISIEREN DER ANTIKÖRPER AUF EINER GOLDOBERFLÄCHE	21
HERSTELLUNG DER PARTIKEL	27
NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN AUF DEN GEPRÄGTEN PARTIKELN	29
AUSWASCHEN DER ANTIKÖRPER	31
MIT PARTIKELN GEPRÄGTE SCHWINGQUARZE	35
MESSEN DES EFFEKTES MIT RHINOVIREN	37
MESSUNGEN VON QUERSELEKTIVITÄTEN	41
VERGLEICH DER NATÜRLICHEN MIT DER ANTIKÖRPER-REPLIK	47
KÜNSTLICHE IMMUNGLOBULINE ZUR DETEKTION VON ANDEREN	
IMMUNGLOBULINEN	48
ZUSAMMENFASSUNG DER MESSUNG VON IMMUNGLOBULINEN MIT ANDEREN	
IMMUNGLOBULINEN	56
DETEKTION VON SESAMPROTEINEN	57
NATÜRLICHE ANTIKÖRPER ZUR DETEKTION VON SESAMPROTEINEN	57

KÜNSTLICHE ANTIKÖRPER ZUR DETEKTION VON SESAMPROTEINEN	70
ZUSAMMENFASSUNG (KÜNSTLICHE ANTIKÖRPER)	92
SENSOREN FÜR TMV UND ÜBERPRÜFUNG IHRER GÜTE MITTELS	
FLUORESZENZMIKROSKOPIE.....	93
HERSTELLUNG DER STEMPEL	93
HERSTELLUNG DER SENSOREN UND QMB-MESSUNG	97
VERGLEICH UND DISKUSSION	121
ZUSAMMENFASSUNG (TMV).....	124
SUMMARY	124
ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME	126
LITERATUR.....	127

Einleitung

Die moderne Chemie dringt in zusehends kleinere Dimensionen vor und versucht die Natur sowohl auf molekularer als auch auf atomarer Ebene zu verändern und zu gestalten. Die Herausforderung für die moderne analytische Chemie besteht darin, immer kleinere Mengen an Analytsubstanz detektieren zu können. Dabei sind molekular geprägte Polymere (Molecular Imprinted Polymers), die in der Lage sind ihr Zielmolekül (wie zum Beispiel Thiole¹, Viren² oder sogar ganze Zellen³) spezifisch zu binden, wegen ihrer potentiellen Anwendungen als Sensoren in der Trenntechnik oder Katalyse immer wichtiger geworden. Die Verwendung von geprägten Nanopartikel hat den Vorteil, dass die Wechselwirkungsfläche sehr stark vergrößert wird.^{4, 5} Solche Partikel können beispielsweise in der HPLC als Säulenmaterial eingesetzt werden. Außerdem wird durch die Verwendung von geprägten Partikeln auch die Selektivität von Katalyse oder molekularer Erkennung erhöht.

Auch in der Medizin sind derartige Anwendungen denkbar, so werden zum Beispiel geprägte Partikel zur Entfernung von Cholesterol aus einem biologischen System eingesetzt.⁶ Antikörper sind aufgrund ihrer immensen Bedeutung für unser Immunsystem und damit für die menschliche Gesundheit natürlich sehr interessante Moleküle. Die vielen existierenden Erkrankungen des Immunsystems, wie AIDS oder Allergien, sind Thema intensiver Forschungsarbeit. Da Biomoleküle wie Antikörper aber in der Regel gegen äußere Einflüsse wenig stabil und zudem teuer sind, wurde in dieser Arbeit versucht, mit Hilfe der Technik des molekularen Prägens von Nanopartikeln künstliche Antikörper aus Polymeren herzustellen. Diese sind gegen äußere Einflüsse stabiler und billiger als ihre natürlichen Analoga und darüber hinaus ohne aufwendige Synthesestufen in hoher Qualität herzustellen.

Die Erforschung des Tabakmosaikvirus (TMV) als ein typischer Pflanzenvirus ist wegen seiner Modellstellung ebenfalls interessant. Es eignet sich besonders gut als Modellvirus, da es relativ groß, robust und relativ einfach in der Gewinnung ist.

Theorieteil

Chemosensoren

Ein Chemosensor ist ein Messfühler, der die An- oder Abwesenheit eines Analyten,

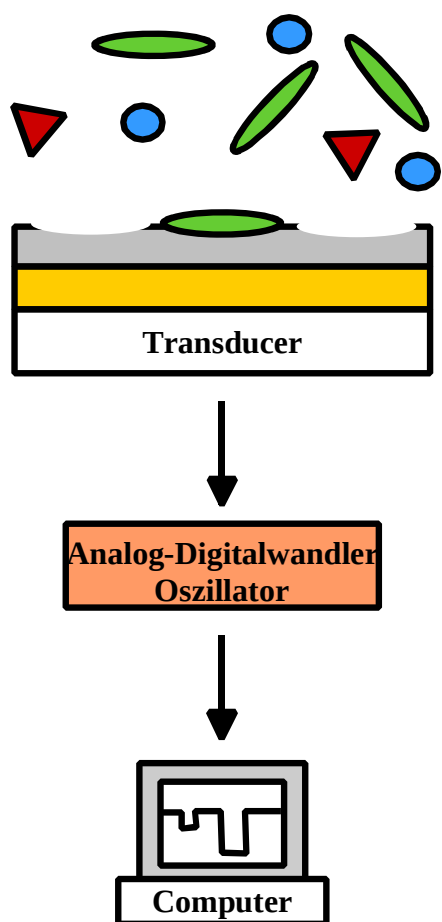


Abb. 1: Prinzip eines Chemosensors. Verschiedene Größen wie z.B. Massenänderung, Kapazität, Widerstand können gemessen werden.

beziehungsweise dessen Konzentrationsänderung in der jeweiligen Phase registriert⁷. Ein Chemosensor besteht im Wesentlichen aus drei Teilen. Der

sensitiven Schicht, einem Transducer und einem Rechner zur Auswertung. Der Transducer sollte im

Stande sein einen Analyten in einer komplexen Matrix nachzuweisen. Dazu lagert der Analyt in die

für ihn selektive Schicht mit möglichst hoher Empfindlichkeit ein. Durch die Einlagerung ändert

die Schicht bestimmte Eigenschaften (wie zum Beispiel Absorption, Widerstand oder die Masse), die der Transducer in ein elektrisches Signal umwandelt.

Der am weitesten verbreitete Chemosensor ist die so genannte Lambdasonde, die in Kraftfahrzeugen in

Verbindung mit einem Katalysator eingesetzt wird, um das Verhältnis von Treibstoff zu Sauerstoff zu

regeln. Hier nutzt man die Potentialänderung zwischen zwei sauerstoffspezifischen Elektroden. Als

sensitive Schicht wird mit Yttrium oder Calcium dotiertes Zirkondioxid verwendet⁸. Eine andere weit

verbreitete Art von Chemosensoren sind die

ionenselektiven Elektroden, zu denen unter anderem die Glaselektrode zählt, mit der man die Aktivität von H_3O^+ Ionen bestimmt und somit den pH-Wert. Die Vorteile des

Chemosensors gegenüber den klassischen chemischen Analysen wie diversen Methoden der Chromatographie oder Spektroskopie sind vor allem die kostengünstige

Herstellung sowie einfache und schnelle Anwendung und individuelle Einsetzbarkeit der Sensoren.

So sollte ein Chemosensor ein reversibles und reproduzierbares Signal liefern, schnell ansprechen, eine stabile Transducerschicht besitzen, selektiv und sensitiv auf den Analyten reagieren und leicht zu bedienen sein.⁹

Quartz Crystal Micro Balances (QMB)

Für die Herstellung Massensensitiver Sensoren nutzt man die Tatsache, dass speziell geschnittene Glasplättchen (AT-Cut) nach Aufbringen von Elektroden Elektrostriktion, also den inversen Piezoelektrischen Effekt, zeigen.¹⁰

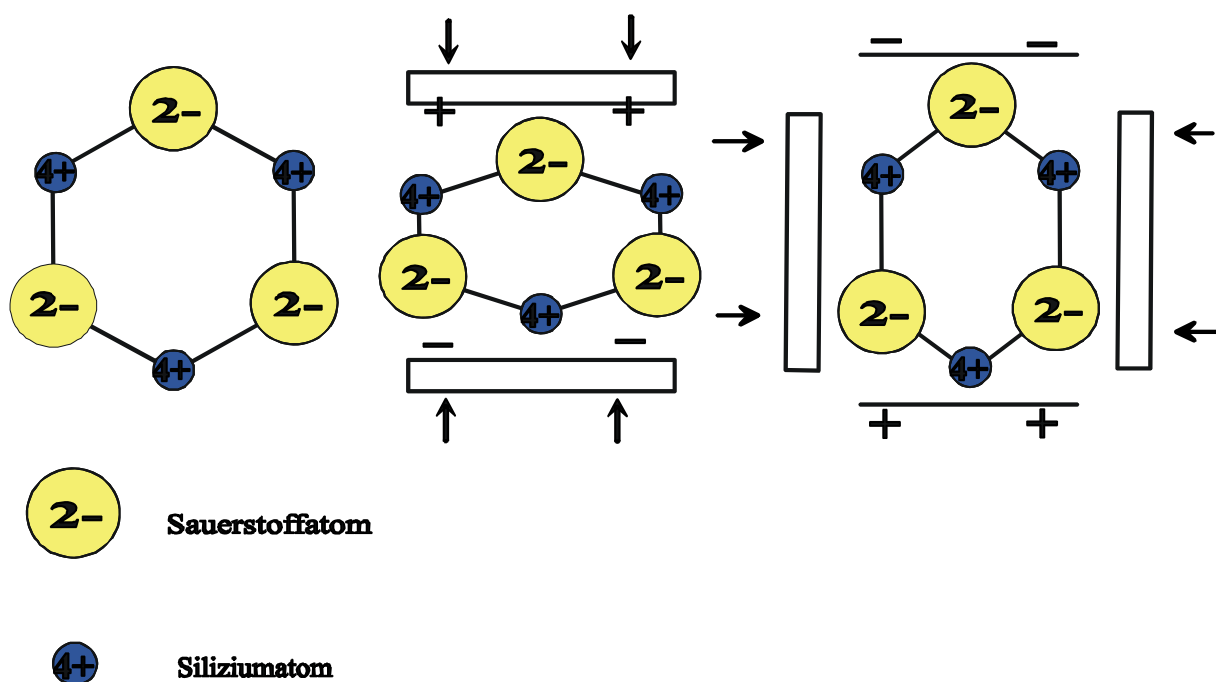


Abb. 2: Piezoelektrischer Effekt

Darunter versteht man die mechanische Deformation des Quarzes bei Anlegen einer Spannung. Legt man Wechselspannung an, so wird eine Dickenschwingung mit einer bestimmten, extrem konstanten Frequenz angeregt. Diese Frequenz ist von der Dicke und in weiterer Folge von der Massebeladung des Quarzes abhängig, was durch die so genannte Sauerbrey-Gleichung beschrieben wird.¹¹

$$\frac{\Delta f}{f_0} = \frac{\Delta d}{d} = -\frac{\Delta m}{\rho A d}$$

Δf = Frequenzänderung

Δm = Massenänderung

ρ = Dichte der Schicht (näherungsweise gleich der von Quarz)

A = Elektrodenfläche

d = Dicke der Schicht

Man kann also die Masseneinlagerung eines Quarzes nach Aufbringen einer sensitiven Schicht auf die Elektroden im Oszillatorschaltkreis messen und erhält so einen Sensor der spezifisch auf einen bestimmten Analyten reagiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Quarzplättchen haben einen Durchmesser von 15,5 mm und sind ca. 0,168 mm dick. Ihre Grundfrequenz beträgt 10 MHz¹².

Atomic Force Microscopy (AFM)

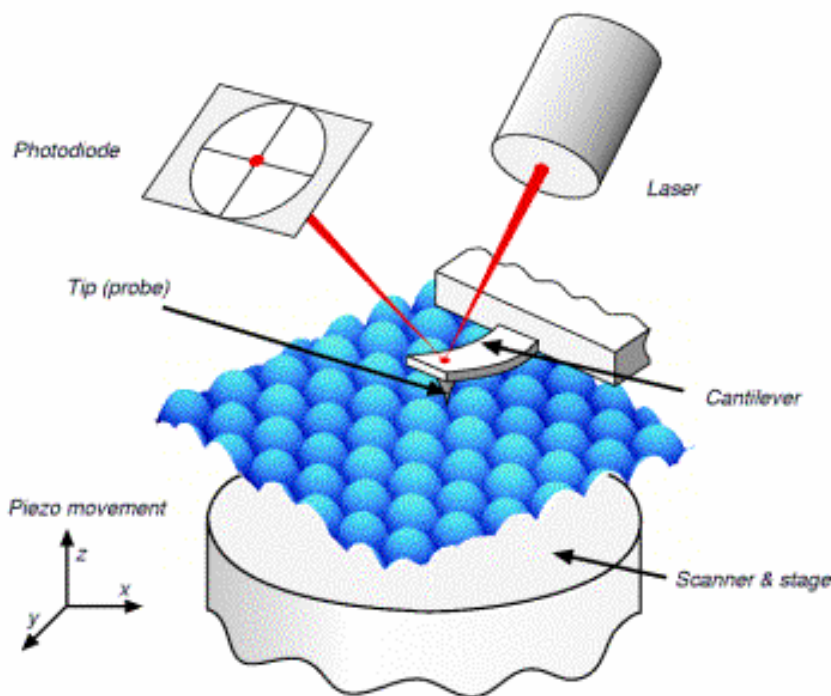


Abb. 3: Prinzip Oberflächencharakterisierung mittels AFM

Rasterkraftfeldmikroskopie (AFM) nutzt die Kräfte aus, die bei kleinen Abständen zwischen der Probe und einer Spitze auftreten, nämlich Van der Waals Kräfte, Coulomb-Kräfte und Kapillarkräfte. Die Spitze erfährt, einige hundert Angström von der Probe entfernt, eine leicht anziehende Kraft der Van der Waals Wechselwirkung.

Sehr nahe an der Oberfläche treffen die Elektronenhüllen von Probe und Spitze aufeinander, was zu stark abstoßenden Coulombkräften (hängt mit $1/r^{12}$ vom Abstand

ab) führt. Die Spitze ist dabei auf einem Metallbügel, dem so genannten Cantilever, befestigt. Dieser ist mit einem reflektierenden Material beschichtet, worauf man mit einem Laser einstrahlt. Wird jetzt der Cantilever gebogen ändert sich die Ablenkung des Lasers. Diese Auslenkung wird detektiert. Man kann auf zwei Arten messen: Im so genannten Contact-Mode und im Tapping-Mode. Beim Contact-Mode fährt die Spitze, von einem piezoelektrischen Scanner gesteuert, über die Oberfläche und steht dabei in direktem Kontakt zu dieser. Es gibt nun die Möglichkeit entweder bei konstanter Höhe zu messen oder bei einer konstanten Kraft. Beim Tapping-Mode schwingt die Spitze mit einer vorgegebenen Frequenz und berührt die Oberfläche während des Ab tastens nur kurz. Dabei misst man das Höhenprofil bei minimaler Beanspruchung der Probenoberfläche.

Abwehrmechanismen des Körpers

Der Mensch ist in seiner Umwelt verschiedensten Gefahren wie Viren, Bakterien und anderen Erregern ausgesetzt. Auch wird er mit entarteten Zellen konfrontiert, die sich im Körper bilden und aus denen Tumore entstehen können. Deswegen verfügt er über drei miteinander kooperierende Systeme, wovon zwei unspezifisch wirken, also nicht zwischen den infektiösen Partikeln unterscheiden. Das erste System besteht aus der Haut, den Schleimhäuten und deren Drüsensekreten. Das zweite befindet sich im Körperinneren und umfasst bakterizide Proteine und phagocytotische Zellen, die jeden körperfremden Eindringling attackieren, was sich in manchen Fällen als Entzündung äußert. Diese sehr schnellen (wirken innerhalb von Stunden), unspezifischen Abwehrmechanismen besitzt der Mensch von Geburt an. Das dritte System ist ein spezifischer Abwehrmechanismus, der im Lauf des Lebens erst aufgebaut und angepasst wird. Da eine Immunantwort eine Zerstörung nach sich zieht, ist es wichtig, dass sie sich ausschließlich gegen Moleküle richtet, die dem Körper fremd sind. Es ist also eine wichtige Eigenschaft des adaptiven Immunsystems zwischen körpereigenen und körperfremden Substanzen zu unterscheiden. Dazu kommt, dass nicht alle körperfremden Stoffe zwangsläufig schädlich sind, einige sind sogar nützlich. Die Aufgabe, das adaptive Immunsystem zu aktivieren, wird vom angeborenen Immunsystem übernommen. Dazu gehört die Produktion spezifischer Abwehrproteine,

sogenannter Antikörper. An ihr sind unterschiedliche Zelltypen beteiligt, die zu den weißen Blutzellen zählen und Lymphozyten genannt werden.¹³

Das spezifische Immunsystem

Der Mensch besitzt zwei Haupttypen von Lymphozyten: B-Lymphocyten (oder B-Zellen) und T-Lymphocyten (oder T-Zellen). Beide zirkulieren im Blut sowie in der Lymphe und konzentrieren sich in der Milz, in den Lymphknoten und in anderen lymphatischen Geweben. Sie lösen eine spezifische Immunantwort auf ihre Antigene aus. B-Lymphocyten reifen im Knochenmark. Sie proliferieren und erzeugen Antikörper, wenn sie Antigenen ausgesetzt werden. T-Lymphocyten reifen in der Thymusdrüse und können ebenfalls zur Proliferation stimuliert werden. Ihre Effektormoleküle bleiben aber fest an die Zellmembran gebunden und werden nicht ausgeschüttet. Es gibt drei Arten von T-Zellen:

- T-Killerzellen, die gezielt bestimmte Zellen zerstören
- T-Helferzellen, die die Reifung von B- und T-Zellen unterstützen
- T-Supressorzellen, die die Wirkung der T-Helferzellen hemmen

B-Zellen und T-Zellen üben unterschiedliche, sich ergänzende Abwehrreaktionen aus.

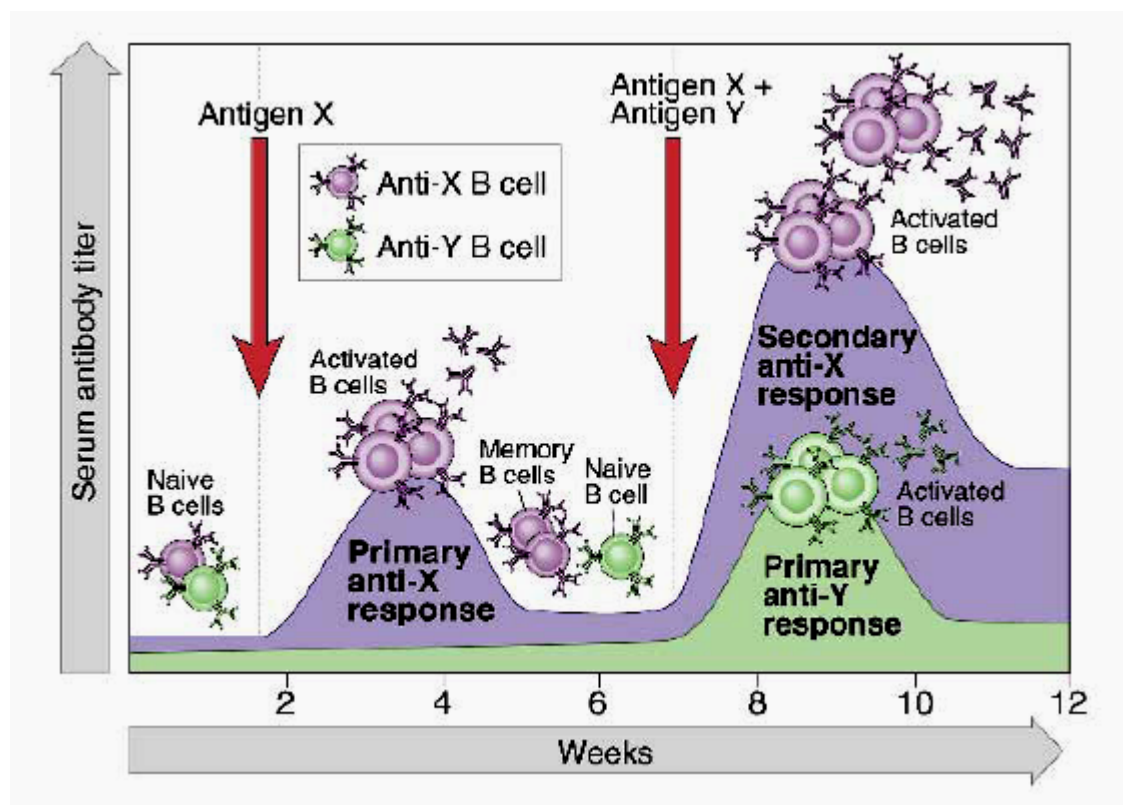


Abb. 4: Schema des immunologischen Gedächtnisses

Im Gegensatz zur unspezifischen, angeborenen Abwehrreaktion des Körpers, die jedes mal gleich verläuft, benötigt die spezifische Immunantwort auf ein Antigen zunächst einige Tage, hinterlässt aber dann ein „immunologisches Gedächtnis“. Daher verläuft die zweite Reaktion schneller und heftiger.

Die Immunglobuline

Die Antigenrezeptoren, die freigesetzt werden oder sich in der Membran der B-Zellen befinden, sind die Immunglobuline. Immunglobuline sind Proteine, die aus zwei identischen, schweren (Molekulargewicht ca. 50000-70000 Da) und zwei identischen, leichten Ketten (Molekulargewicht ca. 25000 Da) bestehen. Es gibt 2 verschiedene Formen von leichten Ketten lambda (λ) und kappa (κ) und 5 Arten von schweren Ketten.

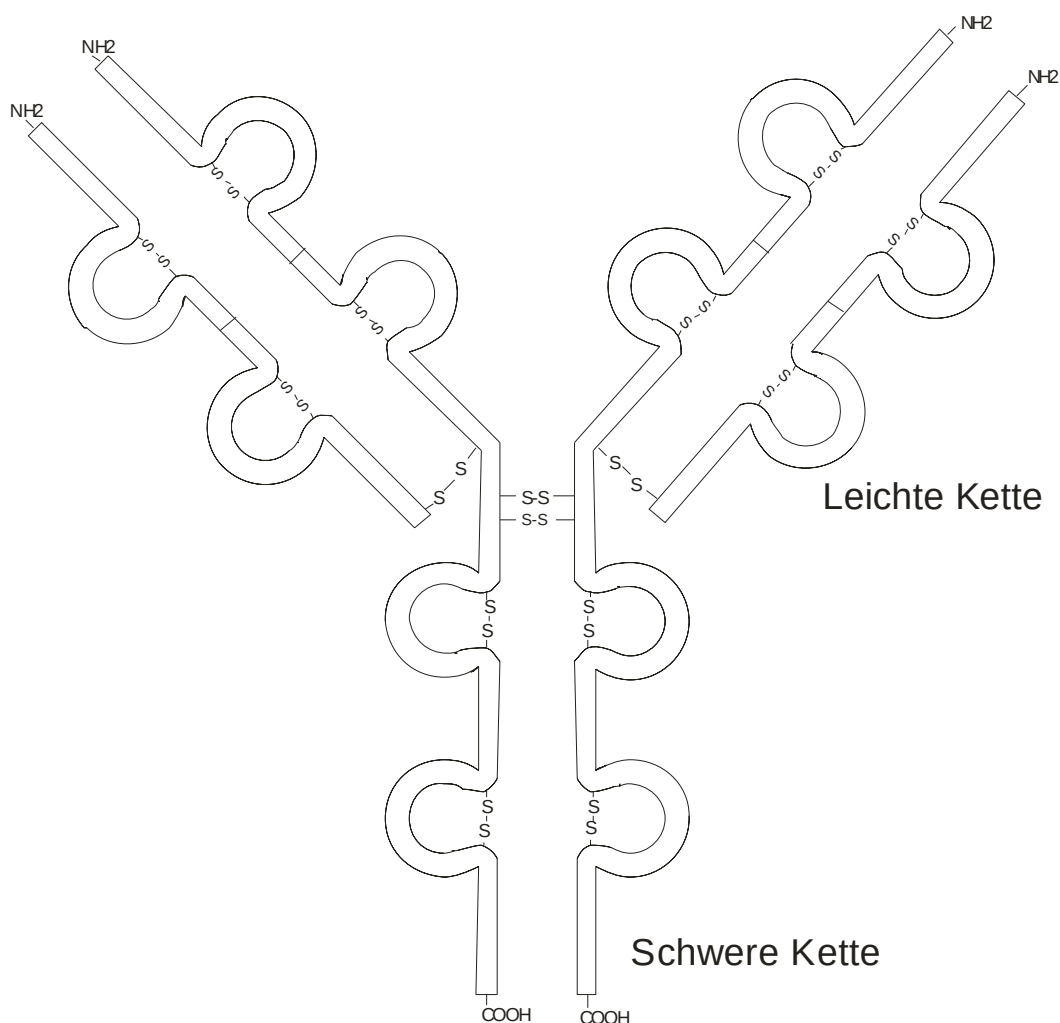


Abb. 5: Schematische Darstellung eines Immunglobulin G

Je nachdem welche schwere Kette der Antikörper beinhaltet, unterscheidet man 5 Klassen von Antikörpern. Alle Klassen können als leichte Kette entweder λ oder κ beinhalten. Die Immunglobuline G wurden in dieser Arbeit verwendet. Sie nehmen eine linsenförmige Gestalt mit einem Durchmesser von etwa 15 nm und einer Dicke von etwa 3 nm an.¹⁴ Sie sind die häufigsten Antikörper beim Menschen, werden über die Plazenta an den Fötus übertragen und stimulieren die Phagozytose durch Makrophagen und andere Zerstörungsmechanismen des Eindringlings. Sie kommen als Tetramere vor. Immunglobuline E spielen eine Rolle bei allergischen Reaktionen und stimulieren Mastzellen zur Freisetzung von Histaminen. Als Bestandteil externer

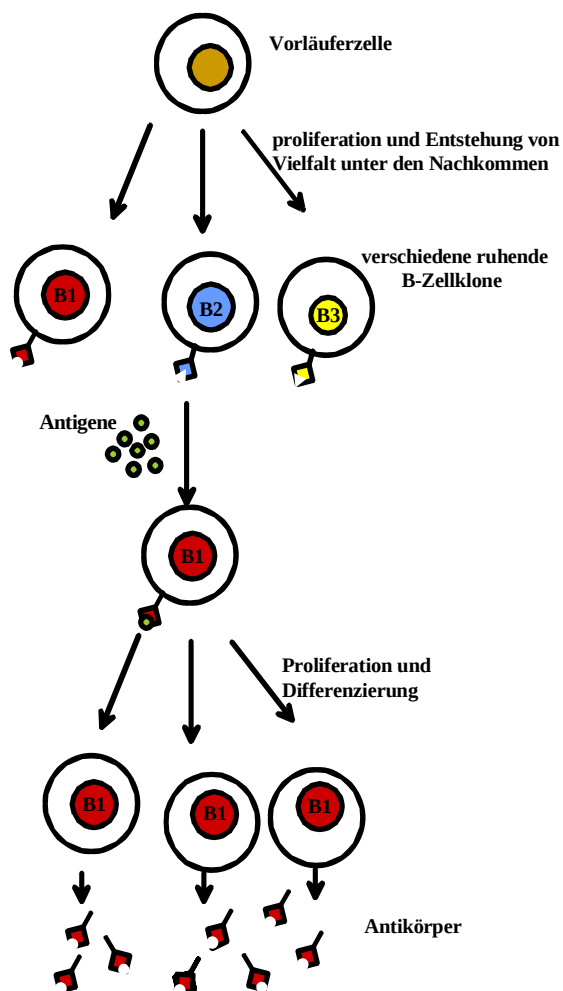


Abb. 6: Entstehung der Vielfalt verschiedener Antikörper. Schema der klonalen Selektion

Antikörper erkennen ihr Antigen im Allgemeinen nicht als Gesamtstruktur, sondern identifizieren es anhand einer lokalen Region auf der Oberfläche, dem Epitop. Die Gene der Antikörper werden von 3 nicht miteinander in Verbindung stehenden

Sekretionen bieten Immunglobuline A lokalen Schutz vor Eindringlingen. Immunglobuline M sind für eine frühe Immunantwort verantwortlich und werden in der Folge von den Immunglobulinen G abgelöst. Immunglobuline D sind auf allen Zellen vorhanden, ihre Funktion ist aber noch ungeklärt.

IgG enthält γ , IgA α , IgM μ , IgD δ , IgE ϵ als leichte Ketten. Die leichten Ketten bestehen aus zwei etwa gleich großen Domänen. Die erste, die konstante Region, unterscheidet sich bei den verschiedenen Immunglobulinen kaum. Die zweite wird variable Region genannt und zeichnet sich durch eine extreme Variabilität in ihrer Aminosäuresequenz aus. Die antigenbindende Domäne ist dabei ausschließlich die variable Region. Jedes Tetramer besitzt 2 Bindungsstellen.

Genfamilien codiert, die auf verschiedenen Chromosomen liegen. Beim Menschen befinden sie sich auf den Chromosomen 2, 22, und 14. Jedes Gen besteht aus einer bestimmten Anzahl codierender Abschnitte. Für jede Kette wird zufällig einer der vorhandenen Abschnitte durch Rekombination mit einem anderen verknüpft. Da dies in den Körperzellen bei der Differenzierung der T- und B-Zellen passiert, wird der Vorgang als somatische Rekombination bezeichnet. Dieser Prozess, die Variation der schweren Ketten und die somatischen Mutationen, führen zu einer hohen Variabilität der Antikörper^{15,16}. Welche dieser vielen Antikörper tatsächlich in großer Menge produziert werden, wird mittels klonaler Selektion entschieden. Dabei wird zufällig eine enorm große Zahl unterschiedlicher Lymphozyten hergestellt. Aus diesem Vorrat werden diejenigen Lymphozyten zur tatsächlichen Aktion spezifisch ausgewählt, die mit Antigenen reagieren können, denen das Tier gerade ausgesetzt ist. Ein Lymphozyt wird also während seiner Entwicklung im zentralen Lymphorgan auf die Reaktivität gegen ein spezifisches Antigen festgelegt, lange bevor er auf das Antigen trifft. Nur die Zellen, die auf ihr Antigen treffen, proliferieren und bilden Immunglobuline, die man im Blutplasma findet. Ein Antikörper zerstört einen antigenen Eindringling nicht direkt, sondern bildet mit ihm einen Komplex, der verschiedene Reaktionen auslösen kann. Die einfachste ist die Neutralisation. Das Antigen ist also durch die Bindung des Antikörpers einfach unwirksam. Phagocytotische Zellen beseitigen den Komplex anschließend. Auch können die gebundenen Antikörper durch einen Opsonisierung genannten Prozess die Anheftung von Makrophagen und damit dessen Phagocytose fördern. Ein weiterer Prozess ist die so genannte Agglutination. Dabei verklumpen die Antigene zusammen mit den Antikörpern (ein Antikörper hat ja 2 Antigenbindungsstellen) und können so leichter von phagocytotischen Zellen gefunden und vernichtet werden. Dadurch können lösliche Antigene auch ausgefällt werden. Auch kann durch die so genannte Komplementfixierung eine Kaskade ausgelöst werden die zur Lyse des Antigens führt. Dabei werden neben anderen auch Proteine ausgeschüttet, die Membranen von Mikroorganismen angreifen, oder Histamine, die eine Verletzung anzeigen und die Blutgefäße permeabler machen. Als Immunadhärenz wird das Phänomen bezeichnet, dass der Immunkomplex sich leichter an Blutgefäße anlagert, wo er von Phagocyten unschädlich gemacht wird.^{17,18,19,20,21}

Viren

Viren (vom lateinischen Virus; Gift, Saft Schleim) sind nichtzelluläre Parasiten, die ein Programm (DNA oder RNA) zu ihrer eigenen Reproduktion enthalten. Sie zählen nicht zu den Lebewesen, da sie keinen eigenen Stoffwechsel besitzen und ohne ihre Wirtszelle nicht in der Lage sind, sich zu vermehren. Viren (außerhalb der Zellen als Virion bezeichnet), sind etwa 15 bis 400 nm große Partikel, die aus Nukleinsäuren (entweder DNA oder RNA) und aus einer Proteinhülle, dem Kapsid, bestehen. Einige Virionen sind von einer Membran umgeben oder besitzen andere zusätzliche Bestandteile.²²

Das Rhinovirus

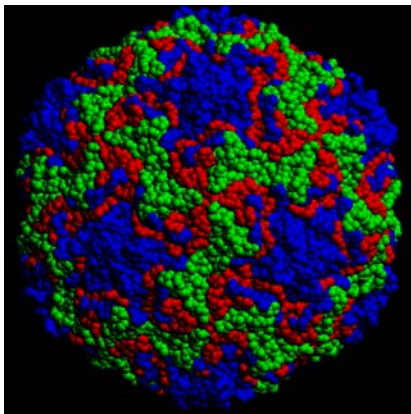


Abb. 7: Kristallstruktur des Rhinovirus

Rhinoviren (rhino = Nase) sind die Erreger des Schnupfens beim Menschen. Sie gehören zur Virusgruppe Picornaviridae, von denen es 117 Serotypen gibt, die sich durch bestimmte Rezeptorgruppen unterscheiden. Alle Rhinoviren sind RNA-Viren und haben eine einsträngige RNA mit etwa 7 kb. Sie besitzen kubische Symmetrie und weisen einen Durchmesser von etwa 25 nm auf.^{23 24 25} Sie sind nackt, besitzen also als Hülle keine Lipidschicht. Sie sind im Vergleich zu anderen Viren (z.B. Enteroviren) relativ säureempfindlich. Sie sind weltweit verbreitet, bevorzugen aber Temperaturen von 33 °C bis 3 °C, die sie zu ihrer Vermehrung benötigen. Bei höheren Temperaturen wie z.B. bei einer Körpertemperatur von 37 °C ist ihr Wachstum hingegen gehemmt. Bezüglich ihrer Rezeptorbindungsfähigkeit unterscheidet man zwei Gruppen: Die größere Gruppe bindet an das so genannte intrazellulär adhesion molecule 1²⁶. Die zweite, kleinere Gruppe bindet an einen Lipoproteinrezeptor²⁷. Die Bindung des Virus verursacht eine Konformationsänderung im Kapsid, der aus 4 Proteinen bestehenden Hülle des Virusgenoms.

Das Maul- und Klauenseuche Virus

Das MKSV gehört ebenso wie das Rhinovirus zur Virusgruppe Picornaviridae. Es verursacht die Maul- und Klauenseuche. Diese tritt hauptsächlich bei Paarhufern wie Rindern, Schweinen, Schafen und Ziegen, gelegentlich aber auch bei Elefanten oder Igel auf. Auch beim Menschen kommt es in seltenen Fällen zu Infektionen.²⁸ Die Inkubationszeit beträgt 2-7 Tage. Die Seuche beginnt mit einer bis zu drei Tagen dauernden Fieberphase. Typische Anzeichen der Infektion sind die Rötung der Maulschleimhaut und Störungen des Wiederkäuens. Im weiteren Verlauf bilden sich in der gesamten Maulschleimhaut sowie im Zungenbereich erbsen- bis taubeneigroße flüssigkeitsgefüllte Blasen, so genannte Aphthen. Diese platzen und bilden großflächige Erosionen. Die Seuche wird vor allem durch Kontakt mit infizierten

Tieren übertragen. Die Verbreitung kann aber auch über die Luft, verseuchtes Futter oder Samenflüssigkeit erfolgen.

Mit dem MKSV wurde 1898 durch Friedrich Löffler erstmals ein tierischer Virus identifiziert. Er entdeckte, dass intravenös verabreichte Lymphe infizierter Tiere auch nach vorheriger Filtration durch bakteriendichte Kieselgurkerzen krankheitsauslösend für gesunde Kälber war. Vom MKSV wurden bis heute 7 Serotypen gefunden, welche sich in zahlreiche Subtypen

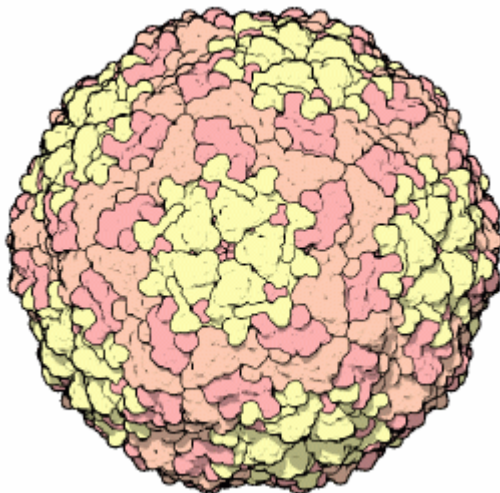


Abb. 8: Kristallstruktur des MKSV

einteilen lassen.²⁹ Das Virus ist ein 25 nm großes rundes Partikel mit einer Sedimentationskonstante von 140 Svedberg. Es besteht aus einer etwa 8500 Basenpaaren langen Einzelstrang-RNA, die von 4 Kapsid-Proteinen umgeben ist (VP1-VP4)³⁰. Die Strukturproteine VP1-VP3 sind in eine 8-strängige, keilförmige β -Fass-Struktur gefaltet und formen so den Hauptteil der Kapsidstruktur. Das VP4-Protein befindet sich im Inneren des Kapsids. Die Oberfläche des Virus wird durch loops gebildet, mit denen die β -Stränge von VP1-VP3 verbunden sind.³¹

Das Tabakmosaikvirus (TMV)

Pflanzenviren wie das TMV verursachen weltweit schwerwiegende Ernteeinbussen für die Landwirtschaft.³² Das Tabakmosaikvirus ist ein 300 nm langes

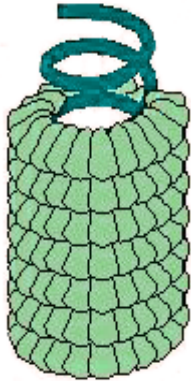


Abb. 9: helicale Struktur des TMV

und 18 nm breites, 40,5 MDa schweres, röhrenförmiges Virus (Innendurchmesser der Röhre etwa 2 nm), welches neben Tabakpflanzen auch Tomaten und Paprika befällt. Es ist der Erreger der Mosaikkrankheit, die ein charakteristisches, mosaikartiges Muster auf den Blättern der befallenen Pflanzen hervorruft, und vor allem durch Berührung übertragen wird. Es besteht aus einer einsträngigen RNA aus ca. 6400 Basen und ca. 2100 identischen Hüllproteinen und gehört zu den Picornaviridae.

Es besitzt keine Lipidhülle und hat einen Sedimentationskoeffizient von 194S. Am Beispiel des TMV wurde 1892 von Dimitri Iwanowski zum ersten Mal nachgewiesen, dass sich Krankheiten über bakterienfreien Extrakt aus Zellsaft übertragen³³. Die Viren haben eine Halbwertszeit von etwa 3000 Tagen, so lange sind sie für die Pflanzen infektiös.³⁴

Sesam und seine Bedeutung als Allergen

Sesam, *Sesamum indicum*, ist eine der ältesten Gewürzpflanzen, die für die



Abb. 10: blühende Sesampflanze (*Sesamum indicum*)

Gewinnung von Speiseöl angebaut werden. Er gehört zur Familie der Pedaliaceae. Die geschälten Samen werden getrocknet oder geröstet für verschiedene Lebensmittel verwendet. Sesam besteht zu 50 % aus Sesamöl, welches größtenteils aus Triglyceriden der einfach ungesättigten Ölsäure (40%) und der zweifach ungesättigten Linolsäure (45%), daneben etwa 10% gesättigten Fetten besteht. Das Öl ist relativ resistent gegen Oxidation, da es das Antioxidans Sesamol enthält und keine dreifach ungesättigten Fettsäuren. Das Öl findet Verwendung als Speiseöl, zur Herstellung von Seifen, in Pharmazeutischen

Produkten oder als Komponente für Insektizide. 25 % des Sesams ist Sesamprotein,

welches relativ stabil gegen Hitze ist und große Mengen an Methionin enthält. Der Gesamtgehalt an Schwefelhaltigen Aminosäuren beträgt 3,8-5,5 %, was einen sehr hohen Wert darstellt. Das Protein besteht zu 65-70 % aus α -Globulin und 30-35 % β -Globulin.

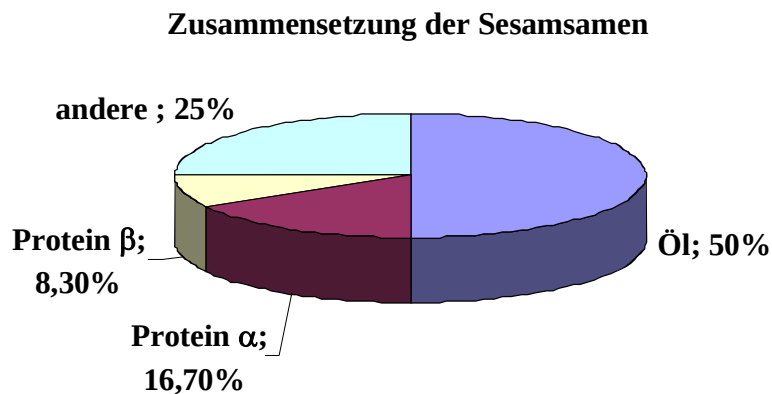


Abb. 11: Zusammensetzung der Sesamsamen ohne Hülle

Das α -Globulin Protein hat einen isoelektrischen Punkt von 4,9 und 12 Untereinheiten mit Molekulargewichten von 8000-85000 Da. Das Molekulargewicht des α -Globulins beträgt etwa 250000.³⁵ Die Wasserlöslichkeit ist sehr hoch in saurem, aber relativ niedrig in alkalischem oder neutralem Milieu. Das entfettete Sesammehl wird als Tierfutter und als Düngemittel verwendet.^{36,37} Sesam gilt außerdem als eines der bedeutendsten Lebensmittelallergene. Deshalb ist es wichtig, Sesamproteine in Lebensmitteln nachweisen zu können.^{38,39} Sesam enthält mindestens 10 allergene Proteine.⁴⁰ Es entfaltet seine allergene Wirkung bereits aber einer Konzentrationen von nur wenigen ppm (mg Sesam/kg Nahrungsmittel). Allergene werden mit bisherigen Methoden direkt als Protein detektiert (immunologisch ELISA wird routinemäßig verwendet) oder über sie codierende spezielle DNA-Fragmente (mittels PCR).⁴¹

Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenz werden Photonen absorbiert und anschließend langwelligeres Licht wieder ausgesendet. Die Fluoreszenz entspricht dem Übergang aus dem niedrigsten angeregten Singlettzustand in den Grundzustand.⁴² Dabei ist das Fluoreszenzspektrum eines Moleküls in der Regel langwelliger als sein Anregungsspektrum. Bindet man einen Fluoreszenzfarbstoff an ein Molekül von Interesse, so kann man es mit hoher Empfindlichkeit messen. Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie und Markern, die selektiv an bestimmte Biomoleküle binden, lassen sich deren interessierende Lokalisationen z.B. in Zellen bestimmen.

Das dazu verwendete Fluoreszenzmikroskop ist wie folgt aufgebaut:

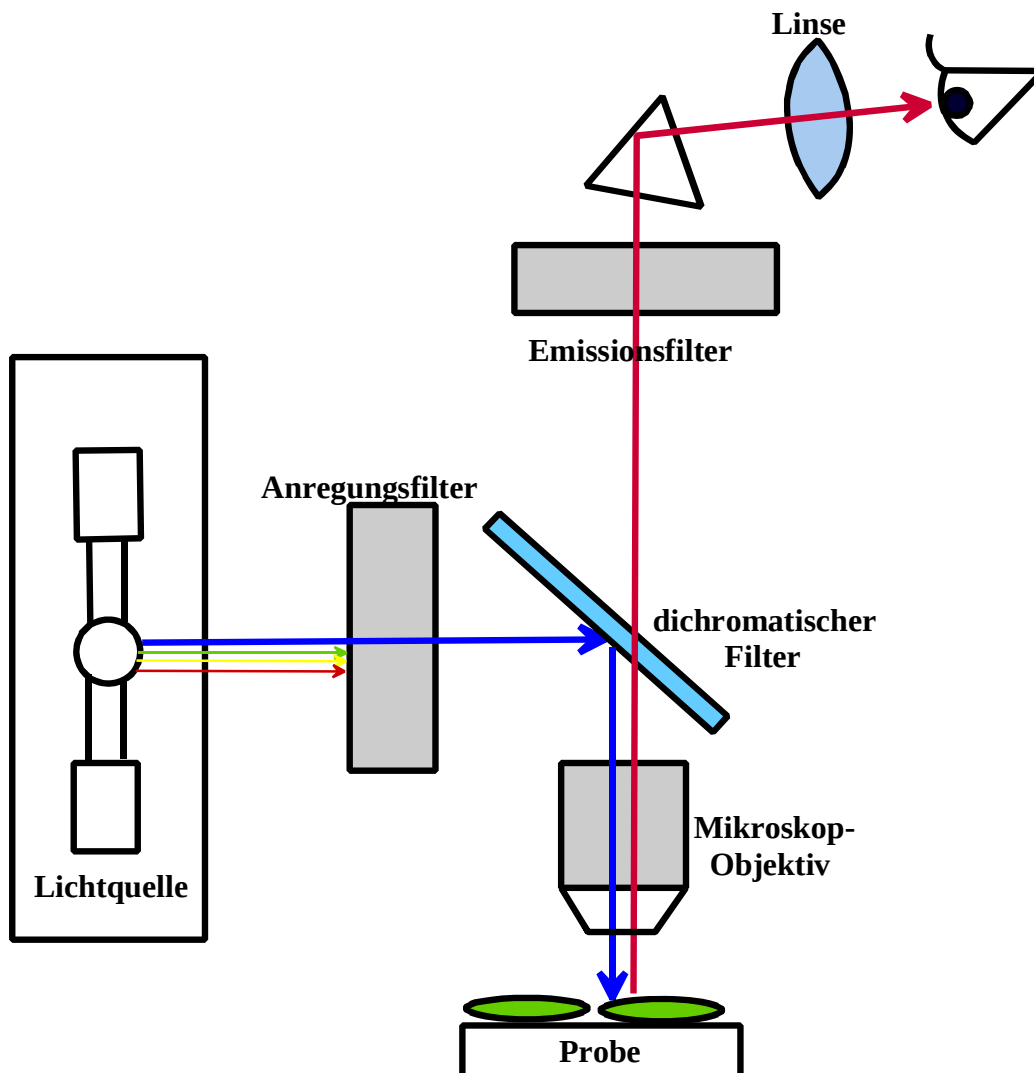


Abb. 12: Schematische Darstellung des Fluoreszenzmikroskops

Aus dem weißen Licht einer Xenon- oder Quecksilberdampf-Lampe wird durch einen Anregungsfilter die für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes geeignete Wellenlänge herausgefiltert. Im Innern des Mikroskops wird dieses Licht von einem so genannten dichromatischen Spiegel auf das Präparat reflektiert. Dichromatische Spiegel haben eine kritische Wellenlänge. Licht mit kleineren Wellenlängen wird reflektiert, Licht mit größeren Wellenlängen durchgelassen. Für die Anregung bei verschiedenen Wellenlängen gibt es unterschiedliche Filter. Diese werden so gewählt, dass die kritische Wellenlänge zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffes liegt. So wird das Anregungslicht durch das Objektiv zum Präparat gelenkt, während das langwelligere Fluoreszenzlicht den Spiegel passiert und zum Auge gelangt.^{43 44 45 46}

Praxisteil

QCM-Sensor basierend auf einem synthetischen Immunglobulin

Das Konzept

Ziel der Arbeit war die Herstellung künstlicher Antikörper aus Polymeren. Zu diesem Zweck wurde zuerst ein Abdruck des jeweiligen Immunglobulins auf Nanopartikeln erzeugt und aushärten gelassen. Danach wurde das Templat wieder ausgewaschen und mit den so hergestellten Partikeln eine auf einem Transducer befindliche Polymerschicht geprägt. So sollte nach Abheben des Stempels ein positiver Abdruck eines Immunglobulins entstehen.

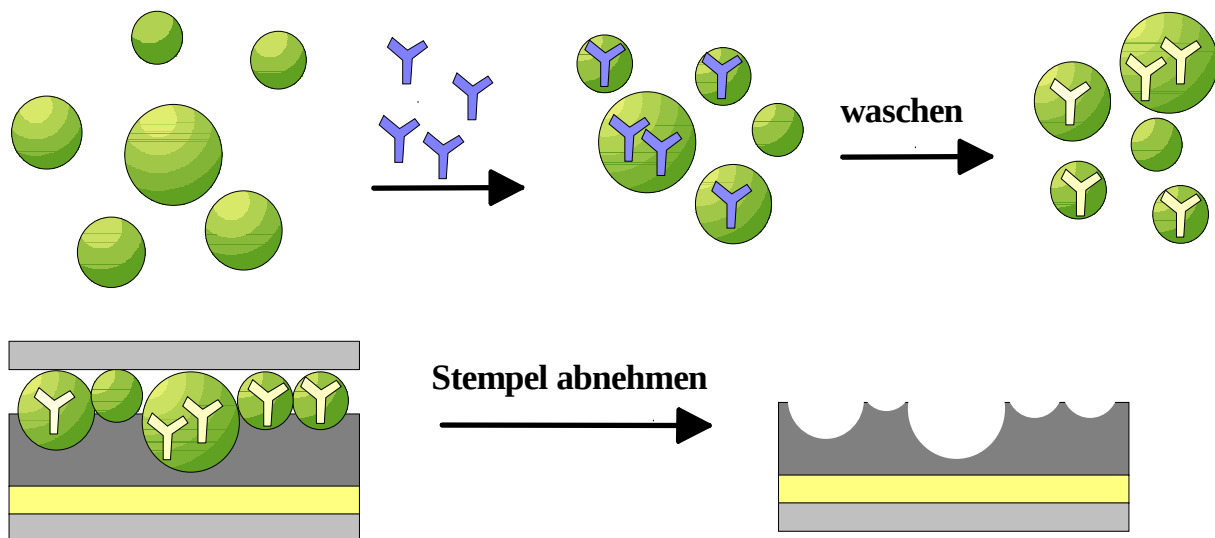


Abb. 13: Konzept zur Herstellung von synthetischen Antikörpern

Der Grund für die Verwendung von Nanopartikeln ist, dass die einzelnen Partikel sehr klein sind und daher jeweils für sich alleine nur eine geringe Wechselwirkungsfläche mit dem Polymer haben. Deshalb ist eine Trennung der Nanopartikel vom geprägten Polymer einfacher als beim Prägen mit einem großflächigen Stempel. In Summe ist die Gesamtoberfläche aber groß, weshalb mehr Analyt gebunden werden kann.

Immobilisieren der Antikörper auf einer Goldoberfläche

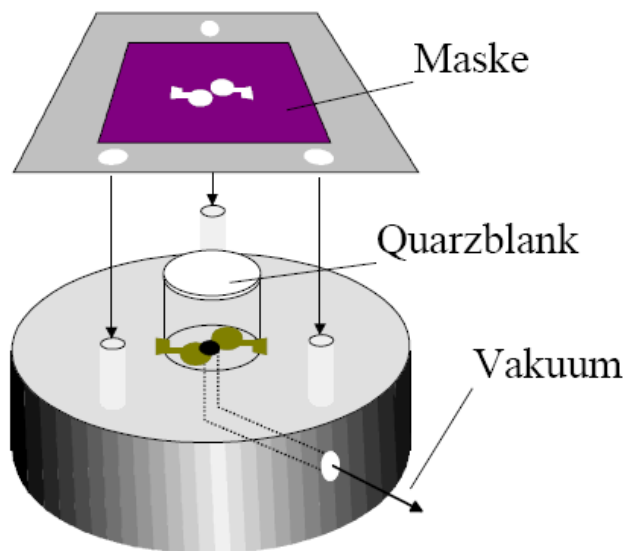


Abb. 14: Aufbringen der Goldelektroden mittels Siebdruck

mit UV-Photolack beschichtet, 40 Sekunden über der Elektrodenvorlage belichtet und der unbelichtete Lack mit Wasser ausgewaschen. Abb. 14 zeigt, wie die Goldelektroden auf den Quarz aufgebracht werden. Ein Quarzblättchen wird positioniert, das Sieb darüber fixiert und die Glanzgoldpaste (GGP 2093 der Firma



Abb. 15: Messzelle

Heraeus) aufgetragen und glatt abgezogen. Anschließend wird das Gold 2 Stunden bei 400°C eingebrannt, wobei organische Reste der Paste verbrennen. Es wurden Quarze, wie oben beschrieben, mit 2 Elektroden hergestellt. Dabei dient die eine Elektrode als Referenz und die andere als Messelektrode. Dies erlaubt unspezifische Effekte oder Frequenzänderungen, die durch Temperatur- oder Dichteänderungen entstehen, von den eigentlichen Messeffekten abziehen.⁴⁷ Die Quarze werden mit N-Methylpyrrolidon über Nacht gewaschen, um eventuell vorhandene Reste organischen Materials zu entfernen. Anschließend spannt man den

Um zu zeigen, dass die künstlichen und die natürlichen Antikörper ähnlich reagieren, misst man zuerst das Verhalten der nativen Antikörper um zu testen ob dieser die angebotenen Viren bindet. Um das Verhalten von immobilisierten Antikörpern zu untersuchen, bringt man Antikörper auf eine Goldelektrode auf die mittels Siebdruck auf einen Schwingquarz gedruckt wird. Dazu stellt man zuerst eine Maske her. Zur Herstellung der Maske mit der gewünschten Form wird ein Sieb einer Maschenweite von 21µm

Anschließend wird das Gold 2 Stunden bei 400°C eingebrannt, wobei organische Reste der Paste verbrennen. Es wurden Quarze, wie oben beschrieben, mit 2 Elektroden hergestellt. Dabei dient die eine Elektrode als Referenz und die andere als Messelektrode. Dies erlaubt unspezifische Effekte oder Frequenzänderungen, die durch Temperatur- oder

Quarz in die Messzelle ein. Die Messzelle besteht aus PDMS/Plexiglas und erlaubt je nach Anforderung eine Adaptierung des Volumens. (siehe Abb. 15) Die Messanordnung besteht aus einer Messzelle, einer Pumpe, einer Oszillatorschaltung, einem Frequenzzähler und einem Rechner für die digitale Erfassung der Daten. Schließlich überprüft man, ob man einen Masseneffekt mit dem Antikörper bekommt. Dabei wird im Durchfluss gemessen. Der Antikörper enthält auch schwefelhaltige Aminosäuren, die ans Gold binden.

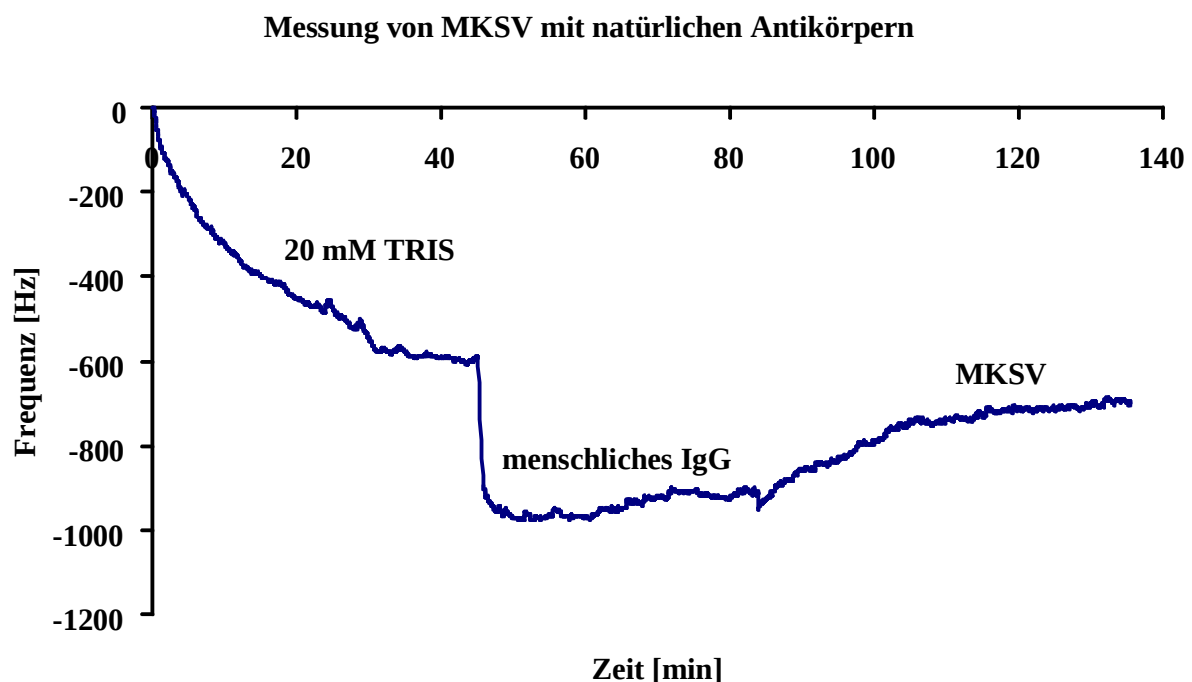


Abb. 16: QMB-Messung mit immobilisierten Antikörpern (3 mg/ml) auf einer Goldoberfläche und MKSV: Man immobilisiert die Antikörper und gibt MKSV zu. Wie erwartet binden die MKSV nicht an den menschlichen Antikörper

Erwartungsgemäß binden die Immunglobuline an die Goldoberfläche. Die so immobilisierten Antikörper können verwendet werden, um deren Antigene zu detektieren. Es werden also verschiedene Antigene und auch Biomoleküle, die keine Antigene sind, gemessen, um zu zeigen, dass die Bindung der Antigene wirklich auf der Bindung an den Antikörper beruht, und um später die Reaktion der künstlichen mit der der natürlichen Antikörper zu vergleichen. Da eine Monolage in etwa einer Sensorantwort von 375 Hz für stehend und von 15 Hz für liegend angeordnete

Immunglobuline entspricht (siehe Abb. 20), ist bei einem Effekt von 2500 Hz die gesamte Elektrode bedeckt, weshalb das Protein nicht direkt an das Gold binden kann.

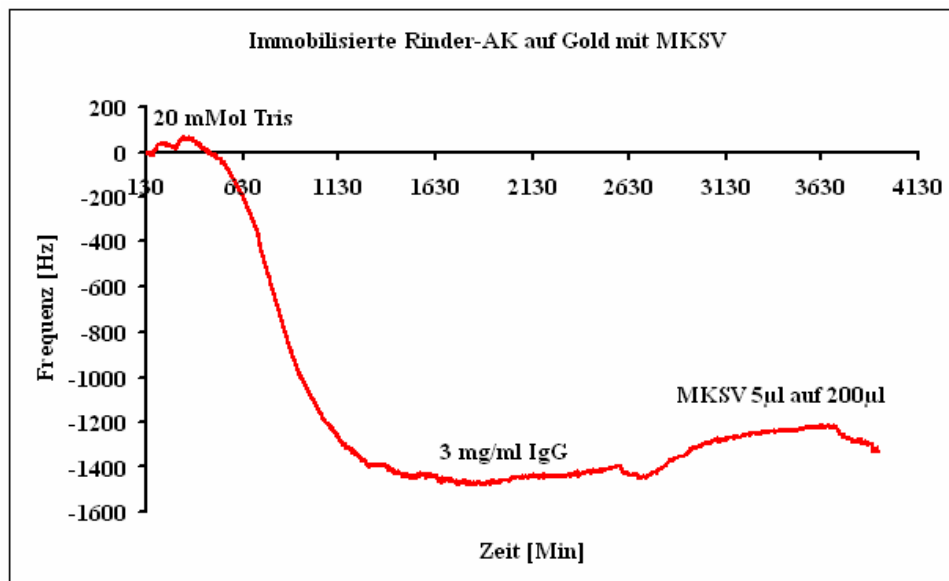


Abb. 17: QMB-Messung mit immobilisierten Antikörpern auf einer Goldoberfläche mit MKSV: Es wurde zuerst 20 mM TRIS injiziert, dann Rinderimmunglobulin und schließlich MKSV. Auch die Rinderantikörper binden nicht an den MKSV (da sie von Rindern stammen, die kein MKS hatten)

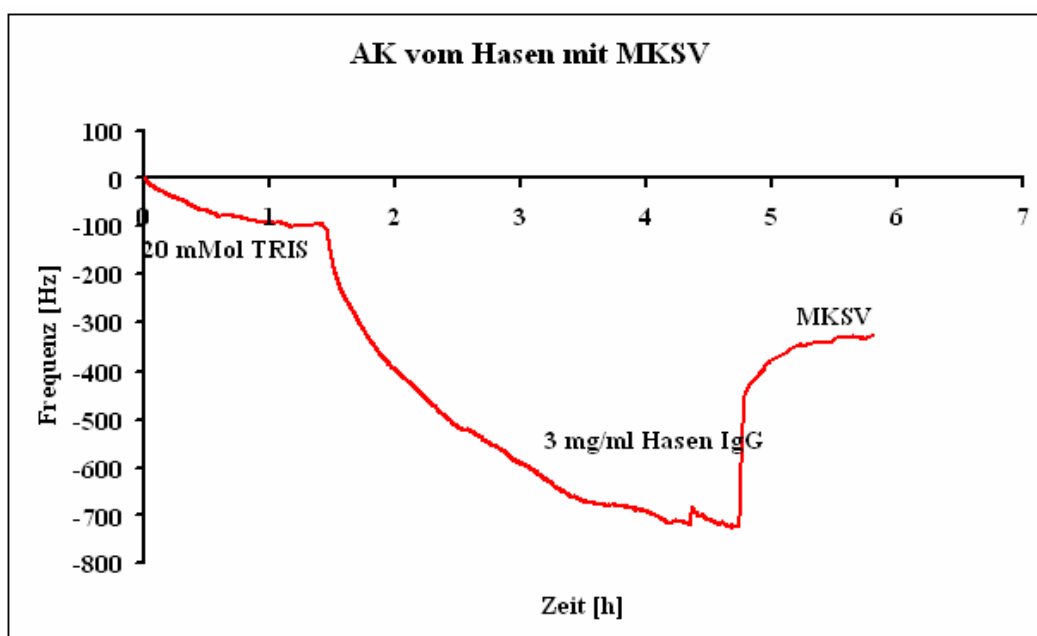


Abb. 18: QMB-Messung mit immobilisierten Antikörpern auf einer nackten Goldoberfläche mit MKSV: Es wurde zuerst 20 mM TRIS injiziert, dann Immunglobulin vom Hasen und schließlich MKSV. Auch die Immunglobuline des Hasen binden den MKSV nicht

Die Versuche mit den nativen Immunglobulinen haben gezeigt, dass das menschliche IgG Rhinoviren bindet, nicht aber MKSV. Das Rinder-IgG bindet ebenfalls nicht an die MKSV, da die Rinder, aus denen Sie gewonnen wurden, keine Maul- und Klauenseuche hatten.

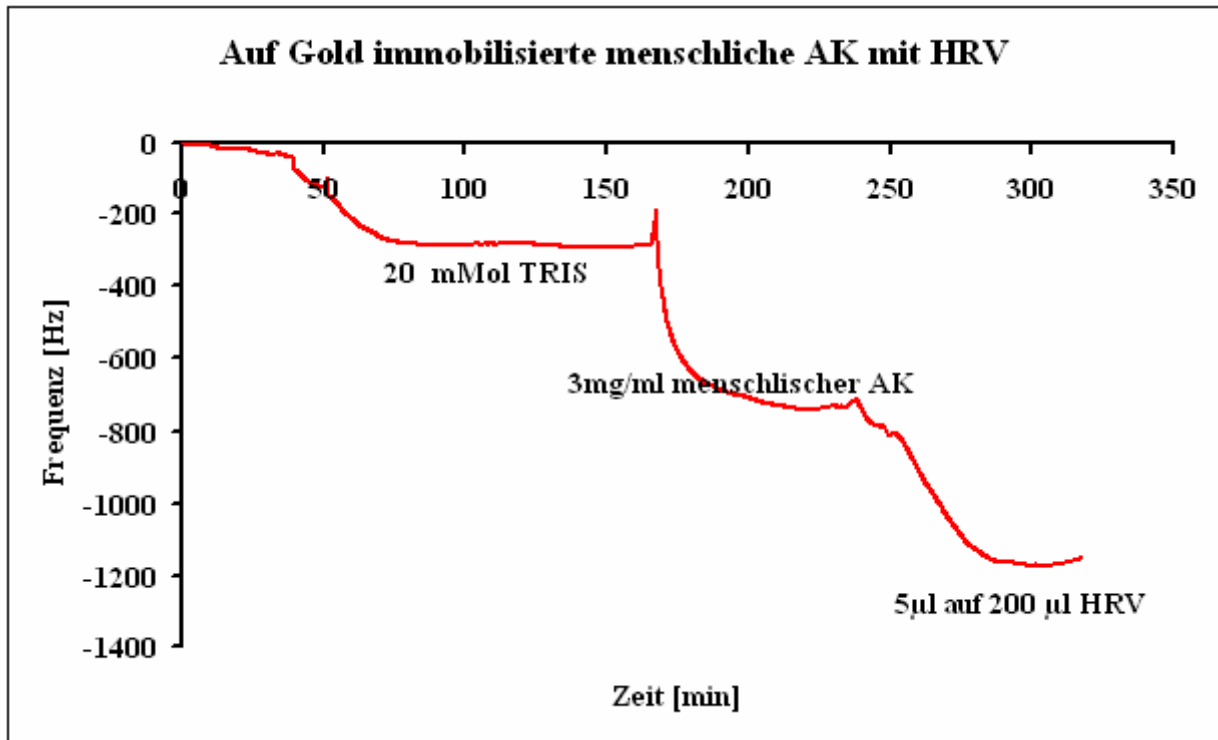
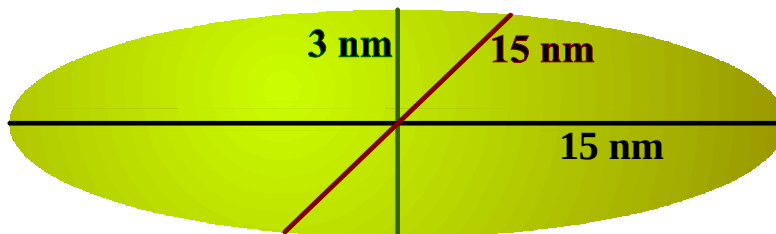


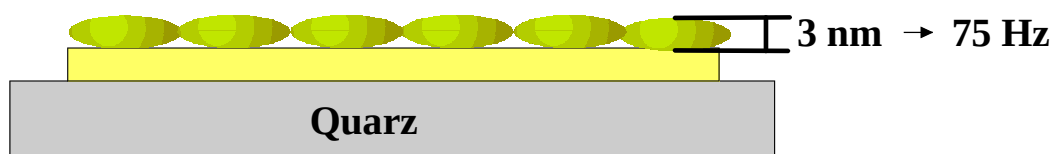
Abb. 19: QMB-Messung mit auf der nackten Goldelektrode immobilisierten Antikörpern und HRV: zuerst gibt man den Puffer zu, dann das Immunglobulin. Dieses bindet an das Gold. Schließlich gibt man den Virus zu, der gebunden wird.

Adsorption von Immunglobulinen auf Gold

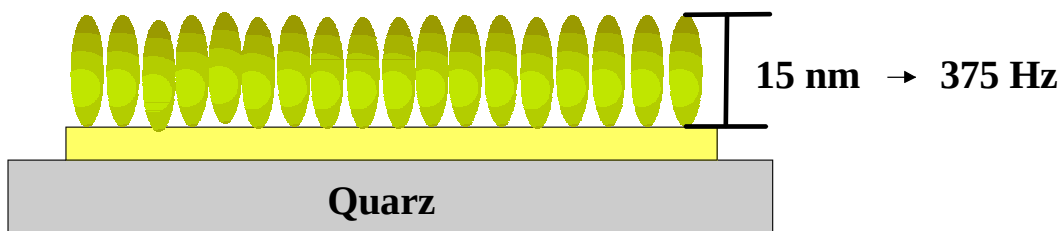
Form eines Immunoglobulins



ideale horizontal geordnete Monolage



ideale vertikal geordnete Monolage



reale Adsorption auf einer Goldoberfläche

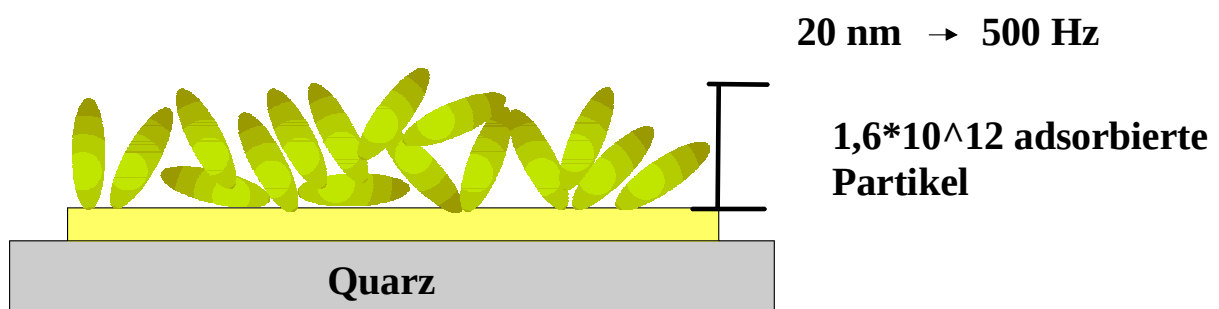


Abb. 20: Adsorption von Immunglobulinen auf einer Goldelektrode. Die adsorbierte Partikelzahl wurde aus der Kurve in Abb. 19 berechnet. (unter der Annahme, dass ein Effekt von 1 kHz (nach Sauerbrey) etwa einer Schichtdicke von 40 nm entspricht, und ein Immunglobulin etwa 150000 Da wiegt.)

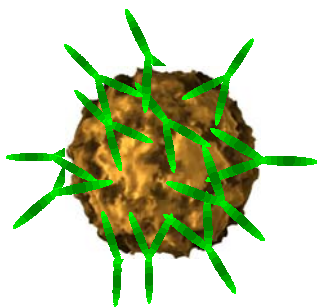


Abb. 21:
Immunglobuline
binden einen
Rhinovirus

Der Messeffekt für die Viren (Abb. 19) beträgt 400 Hz, was einer Adsorption von $2,23 \cdot 10^{10}$ Viren entspricht. Daraus ergibt sich ein Verhältnis von gebundenem IgG zu gebundenem Virus von etwa 70:1. Dieser Wert ist plausibel, da der Antikörper viel kleiner ist als das Virus und auch in ihrer natürlichen Umgebung fast immer mehrere Immunglobuline an ein Pathogen binden. Die Antikörper der verschiedenen Organismen sind chemisch recht ähnlich, was in recht ähnlichen IR-Spektren resultiert.

IR-Spektren der verwendeten Antikörper

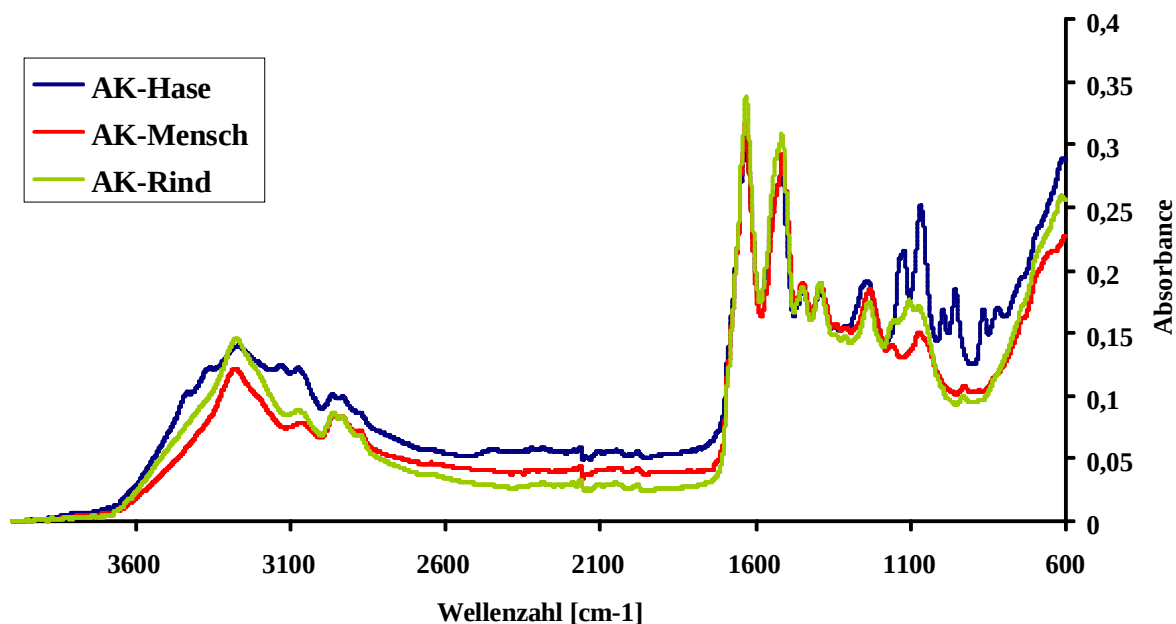


Abb. 22: IR-Spektren (gemessen mittels ATR auf einer Diamantzelle) der verwendeten Antikörper: Wie man sieht, sind die Spektren grundsätzlich recht ähnlich und vor allem die Spektren des IgG vom Rind und das des menschlichen unterscheiden sich nur leicht im Fingerprintbereich. Der das Spektrum des Antikörpers vom Hasen ist unterschiedlicher (Fingerprintbereich aber auch höhere Absorption im Bereich der NH und OH-Valenzschwingungen).

Herstellung der Partikel

Der Grund für die Verwendung von Nanopartikeln ist, dass sie sehr klein sind und jedes Einzelpartikel eine geringe Wechselwirkungsfläche mit dem Polymer hat. Daher kann man die beiden Polymere gut trennen. Die gewünschten Partikel wurden mittels Präzipitationspolymerisation hergestellt. Für diese spezielle Anwendung hat sich ein Copolymer aus Acrylsäure und Vinylpyrrolidon (siehe Tabelle Polymer 2) als am besten geeignet erwiesen. Alle Komponenten mit Ausnahme des Radikalstarters (Kaliumperoxidisulfat) werden dazu in 800µl Wasser gelöst (kurz bei 70°). Wenn sich der Quervernetzer vollständig gelöst hat, gleicht man den pH-Wert aus (mit KOH auf pH=7) und gibt den Starter zu. Dann polymerisiert man unter UV-Licht bis zum Gelpunkt. Für die geprägten Partikel gibt man Antikörper hinzu, nachdem man den Starter gelöst hat und polymerisiert erst dann. (Es ist wichtig den Antikörper nach dem Starter, oder den Starter verdünnt in Lösung zuzugeben, da er stark oxidierend wirkt und den Antikörper denaturieren kann.) Die Polymerisation dauert etwa 20 min und verläuft bei dem reinen Prepolymerisat etwas schneller als mit dem Antikörper. Das liegt daran, dass die Ordnung im Polymer weniger gestört ist und im gleichen Volumen mehr Monomermoleküle vorhanden sind.

	Polymer
DHEBA	60 mg
Methacrylsäure	50 mg
Vinylpyrrolidon	20 mg
Kaliumperoxidisulfat	1,5 mg

Tabelle 1: Zusammensetzung des verwendeten Polymers

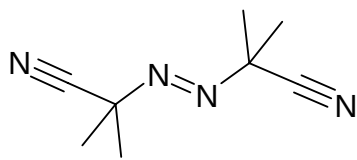
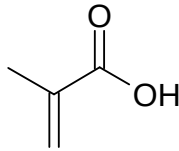
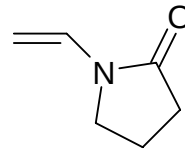
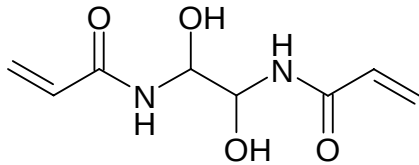
**Azobisisobutyronitril****Methacrylsäure****Vinylpyrrolidon****DHEBA**

Abb. 23: Verwendete Komponenten

Man bringt das Präpolymerisat (20 ml/l) in eine Lösung, mit der es nicht oder nur schlecht mischbar ist und lässt unter heftigem Rühren polymerisieren (über Nacht). Acetonitril als Lösungsmittel hat sich dafür als geeignet herausgestellt. Die Größe und Beschaffenheit der Partikel wurde mittels AFM überprüft.

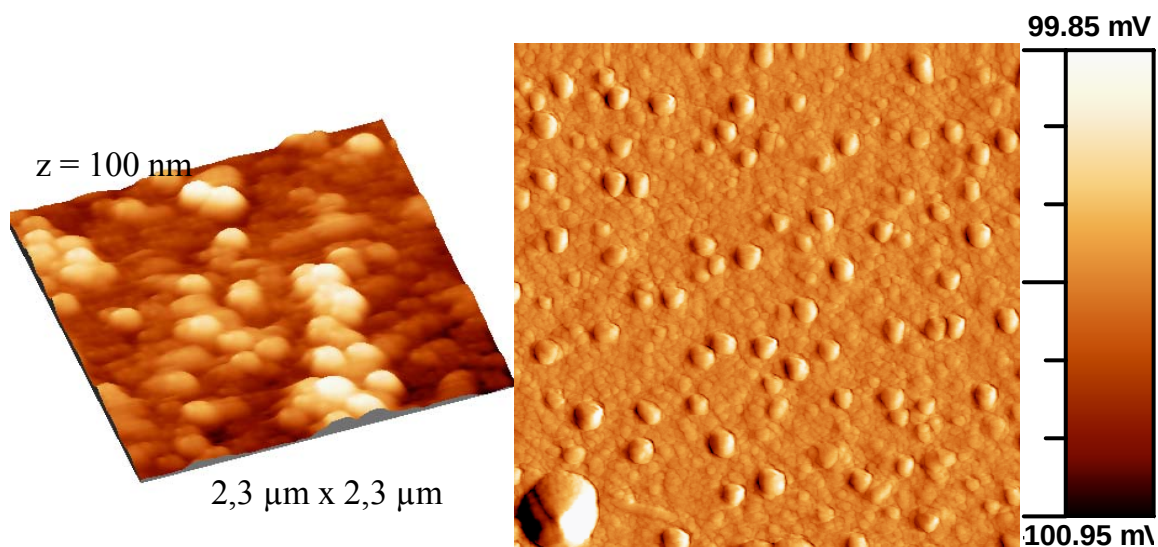


Abb. 24: AFM-Aufnahme der Partikel auf Glas

Die Größe der Partikel beträgt zwischen 10 und 600nm (und kann durch Änderung der Menge, die ins Lösungsmittel gebracht wird, sowie der Dauer der Vorpolymerisation gesteuert werden; je mehr umso größer die Partikel).

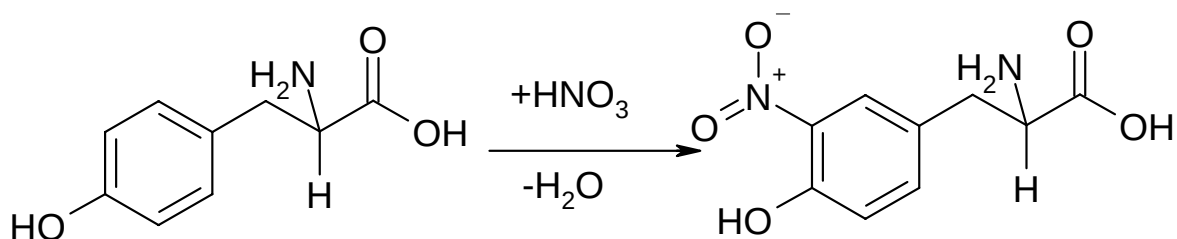
Nachweis von Antikörpern auf den geprägten Partikeln



Abb. 25: Reaktion mit HNO_3 von Partikeln mit (gelb) und ohne Antikörper (farblos)

Um zu verifizieren, dass die Partikel auch tatsächlich die Antikörper enthalten, vergleicht man zwei Arten von Partikeln: Zum einen die geprägten Partikel und zum anderen Referenz-Partikel, die auf die gleiche Weise behandelt wurden, aber ohne Zugabe von Templat. Dazu wurde eine Farbreaktion zum Proteinnachweis, die sogenannte Xanthoproteinreaktion, durchgeführt.⁴⁸ Bei dieser wird ausgenutzt, dass der phenolische Ring des Tyrosins (und

Tryptophan) durch Anwendung konzentrierter Salpetersäure eine Nitrierung erfährt und das Produkt gelb gefärbt ist.



Diese Reaktion wurde zuerst mit der wässrigen Lösung des Antikörpers durchgeführt, welche sich bei Zugabe der Salpetersäure gelb färbt. Dann fügt man den geprägten Partikeln Salpetersäure hinzu und erhält eine farblose Lösung mit gelben Partikeln. Der gleiche Versuch mit den Referenzpartikeln ergab eine farblose Lösung mit farblosen Partikeln. Die Reaktion kann also zum Nachweisen des Antikörpers verwendet werden. Zusätzlich kann man die Partikel mit dem IR-Spektrometer mittels ATR-Zelle messen.

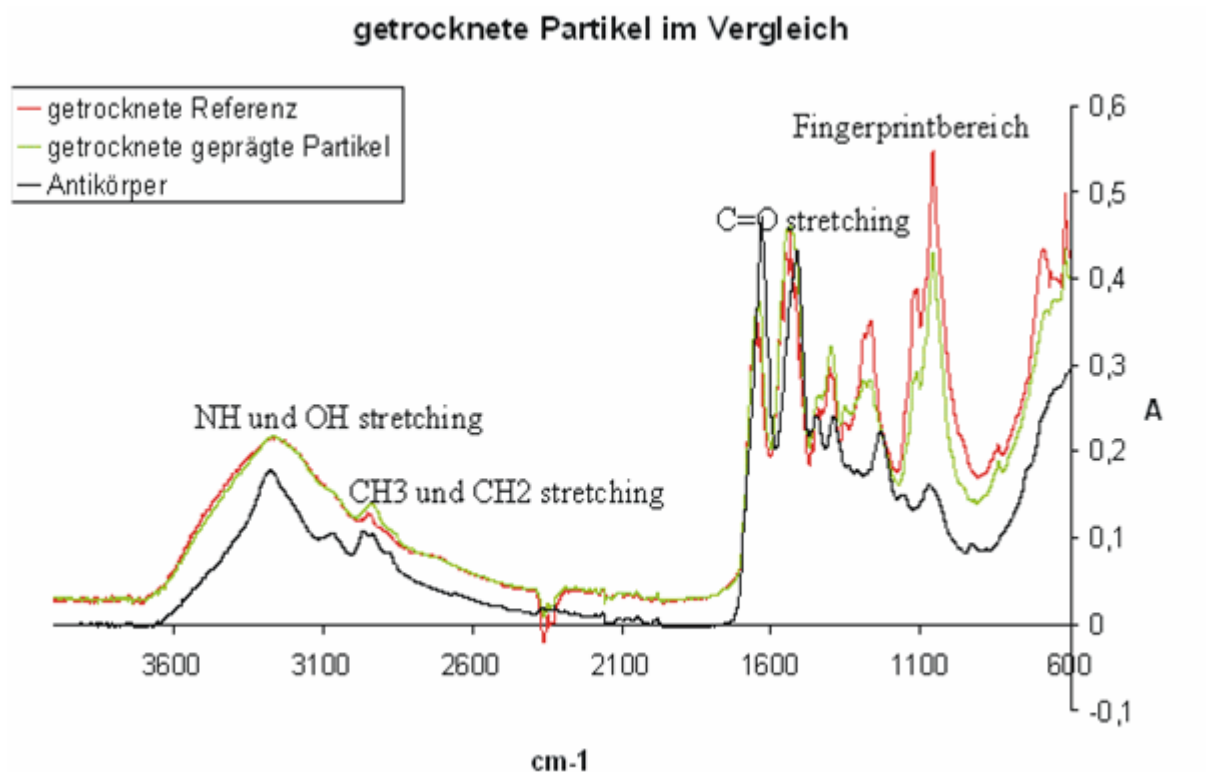


Abb. 26: IR-Spektren der geprägten Partikel und der Referenzpartikel gemessen mittels ATR auf einer Diamantzelle: Da die Spektren der Antikörper und die des Polymers sehr ähnlich sind, ist auch das Summenspektrum der geprägten Partikel und der Referenz fast identisch.⁴⁹

Die erhaltenen Spektren sind sehr ähnlich, aber bei den geprägten Partikeln ist zum Beispiel die C=O-Bande höher. Zusätzlich kann man eine Nachweisreaktion mit Dansylchlorid durchführen. Das ist ein Fluoreszenzmarker, der Proteine anfärbt.

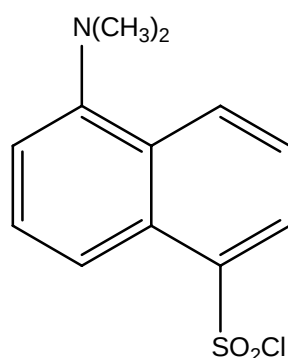


Abb. 27: Strukturformel von Dansylchlorid

Dazu wird eine Lösung von Dansylchlorid der gleichen Menge der Partikelsuspension zugegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Führt man diesen Versuch mit den geprägten und den ungeprägten Partikel durch, so erhält man folgendes Bild:

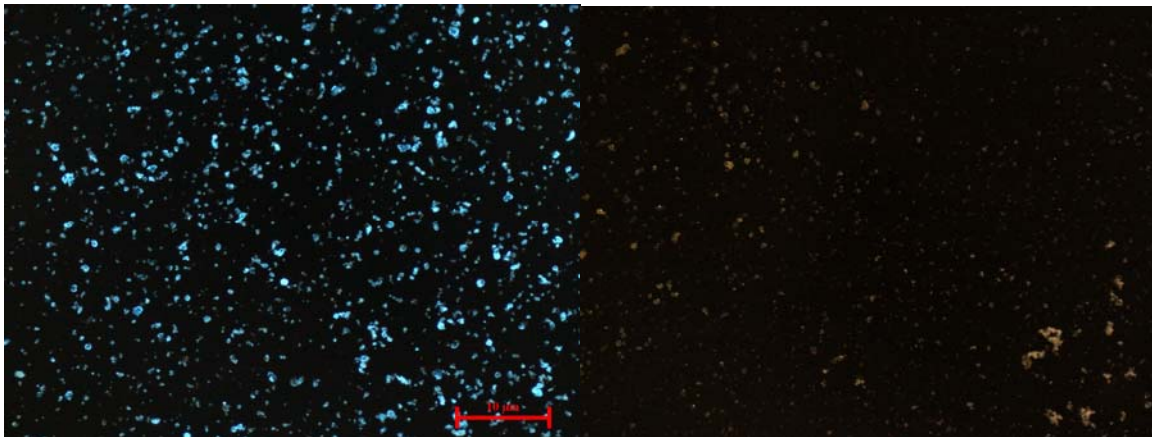


Abb. 28: Geprägte (links) und ungeprägte (rechts) Partikel markiert mit dem Proteinmarker Dansylchlorid (die Länge der roten Markierung entspricht 10 μm)

Das linke Bild zeigt die geprägten Partikel mit dem markierten Antikörper darauf, das rechte die ungeprägten Partikel, die auf die gleiche Art und Weise behandelt sind. Wie man sieht, lässt sich damit der Antikörper auf den geprägten Partikeln nachweisen. Die ungeprägten Partikel zeigen kaum Färbung.

Auswaschen der Antikörper

Um die Partikel zu waschen, zentrifugiert man die Suspension. Dabei sedimentieren die Polymerkügelchen und man kann den Überstand dekantieren. Um sicher zu gehen, dass die Partikel vollständig abzentrifugiert waren, sollte der Überstand mit AFM gemessen werden (Lösung auf ein Glasplättchen gebracht und getrocknet). Im Überstand konnten aber keine Partikel nachgewiesen werden. Nach dem Dekantieren wäscht man zweimal mit Wasser, wobei man mit Wasser auffüllt (15 ml Greinerröhrchen) und etwa eine Minute mit Ultraschallbad behandelt. Dann wird wieder zentrifugiert, der Überstand verworfen und nochmals gewaschen. Den Erfolg des Waschprozesses kann man überprüfen, indem man den Überstand, der keine Partikel enthält, mittels UV-VIS-Spektroskopie analysiert. Die Partikelsuspension direkt zu vermessen, ist problematisch, da auch das Polymer im gleichen Bereich absorbiert. Zusätzlich führt die Messung zu keinen reproduzierbaren Resultaten, da es

durch die Partikel zu Streuung des Lichtes kommt, die durch die rasche Sedimentation der Partikel variiert.

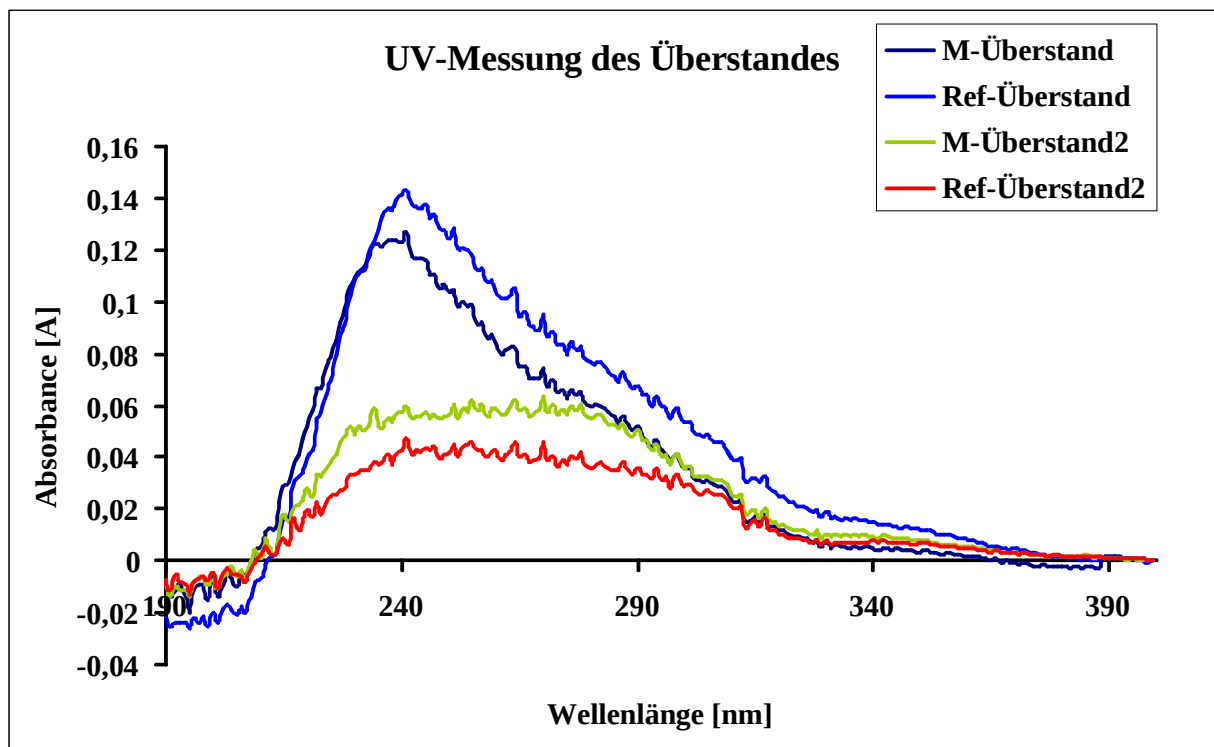


Abb. 29: UV-Spektren des Überstandes (der mit menschlichem IgG geprägten Partikeln) nach dem ersten und dem zweiten Waschschrift

Es wurden nach jedem der beiden Waschschrift die Überstände vermessen. Vor allem beim ersten Waschschrift wurden noch sehr viele Monomerreste ausgewaschen, weshalb auch der Überstand der Referenzpartikel, der zum Vergleich vermessen wird, absorbiert. Deswegen wurde die Differenz der beiden Überstände (geprägt – Referenz) nach dem ersten Waschschrift und nach dem zweiten Waschschrift berechnet. (Abb. 30)

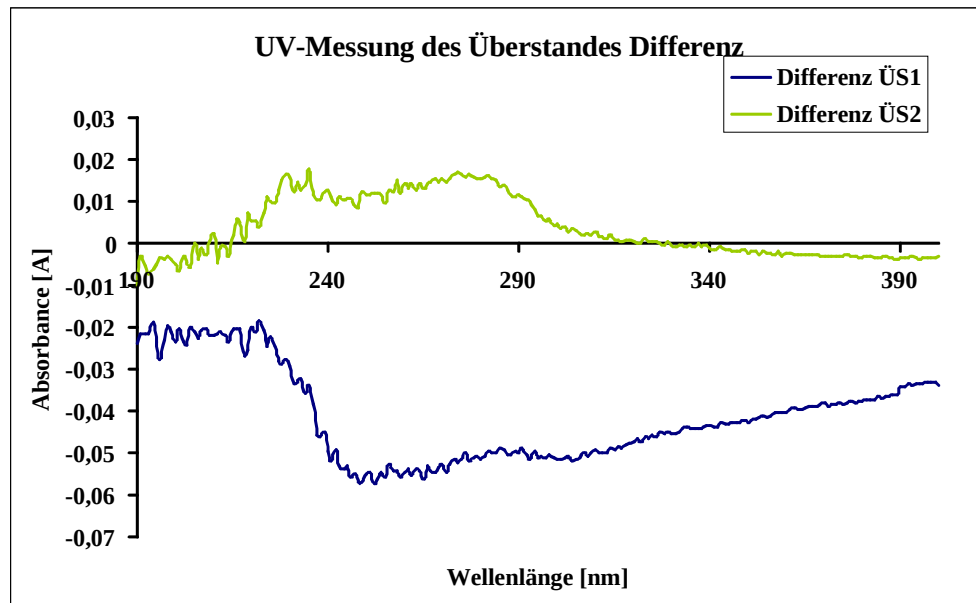


Abb. 30: Differenzspektren zwischen dem Überstand der geprägten (mit menschlichem IgG) und der ungeprägten Partikel

Aus der Differenzberechnung sieht man, dass bei dem ersten Waschschrift noch sehr viel Monomerrest ausgewaschen wird. Der Grund dafür ist, dass ja der Antikörper von der gesamten Masse nur einen relativ geringen Teil ausmacht (etwa 2% der Gesamtmasse bestehend aus Monomermasse + Protein). Man erkennt aber deutlich schon bei der ersten aber noch besser bei der zweiten Differenzkurve die Proteinbande bei 280 nm. Zur Bestimmung der ausgewaschenen Konzentration nimmt man noch die Spektren des Antikörpers von verschiedenen konzentrierten wässrigen Lösungen auf.

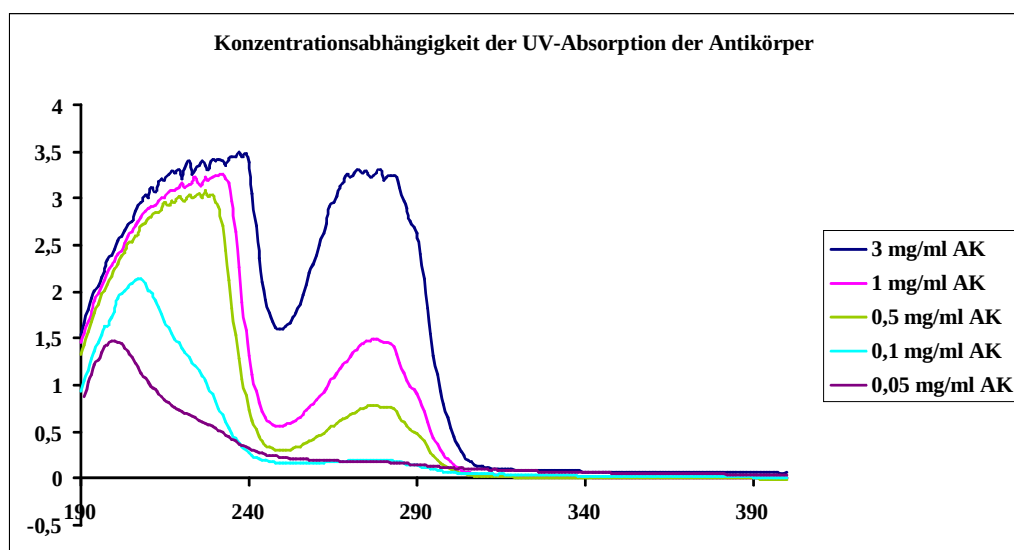


Abb. 31: Konzentrationsabhängigkeit der UV-Absorption der menschlichen Antikörper in verschiedenen Konzentrationen

Aus den Spektren der verschieden konzentrierten Lösungen wurde eine Eichgerade für die Konzentrationsabhängigkeit erstellt.

Konzentration AK	[mg/ml]	Absorption [A]
3		3,29
1		1,47
0,5		0,76
0,1		0,19
0,05		0,17

Tabelle 2: Konzentrationsabhängigkeit der UV-Absorption

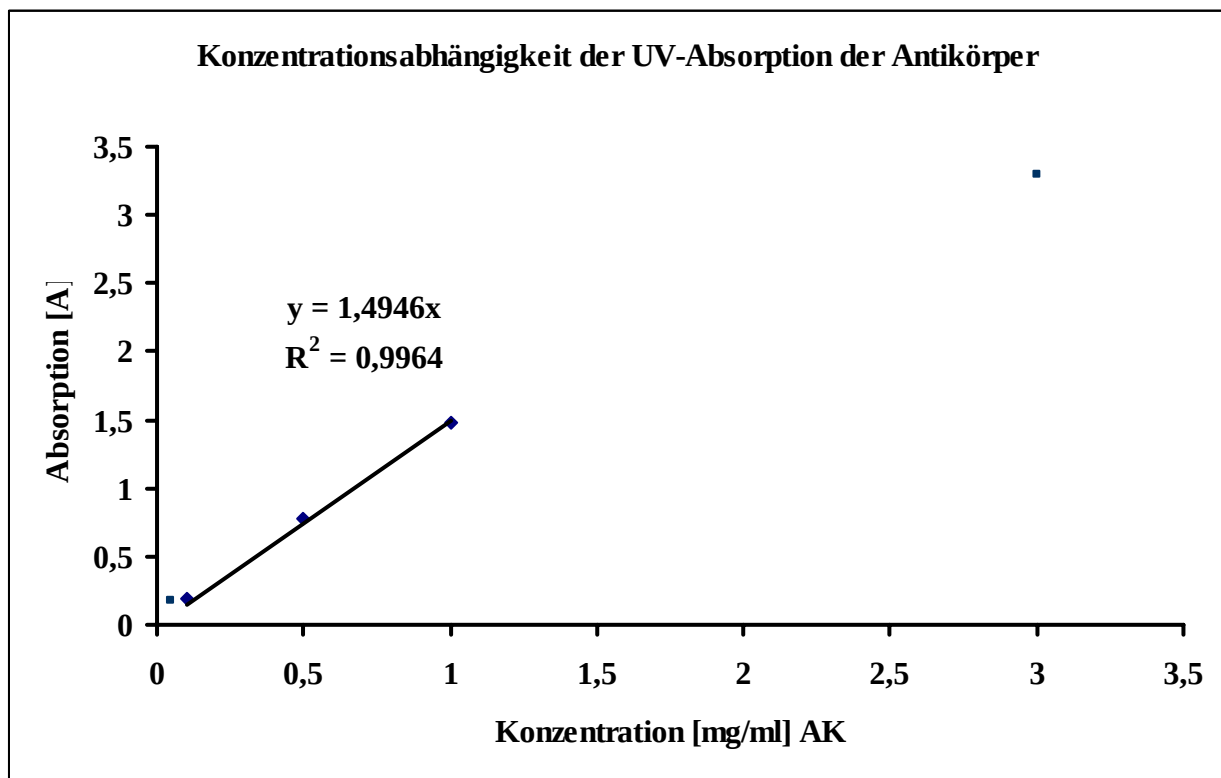


Abb. 32: Konzentrationsabhängigkeit der UV-Absorption des menschlichen Antikörpers

Für die Erstellung der Gerade wurde der letzte Punkt weggelassen, da er vermutlich bereits im Sättigungsbereich liegt. Durch Einsetzen in die Geradengleichung kann man die Konzentration des ausgewaschenen Antikörpers berechnen. Man erhält 1:0,007 mg/ml für den ersten und 0,011 mg/ml für den zweiten Waschschrift. Wenn man mitberücksichtigt, dass 15 ml zum Waschen verwendet wurden erhält man 0,26 mg Protein, die insgesamt herausgewaschen wurden. Da für die Herstellung der Partikel 600 µl des verdünnten Prepolymerisats verwendet wurden, entspricht die

Gesamtmenge an Protein in der eingesetzten Menge 1 mg. Es wurden also etwa 26 % des eingesetzten Proteins heraus gewaschen. Dieser Wert ist zufrieden stellend, da sich ja vermutlich ein Teil des Proteins auch im Inneren der Partikel befindet und somit nicht ausgewaschen werden kann.

Mit Partikeln geprägte Schwingquarze

Es wurde ein Schwingquarz hergestellt, dessen erste Elektrode Imprints von geprägten Partikeln enthält und dessen Referenzelektrode Imprints von ungeprägten Partikeln besitzt. Die Referenz dient dazu, unspezifische Effekte wie Viskositätsunterschiede oder Temperaturschwankungen zu kompensieren. Zur Stempelherstellung trägt man etwa 10 µl der Partikelsuspension (geprägte für die Messelektrode und ungeprägte für die Referenz) auf ein 5 x 5 mm Glasplättchen auf und lässt diese eintrocknen. Anschließend wird das Prepolymerisat entweder mittels Spincoating oder mittels Dropcoating auf den wie oben beschrieben hergestellten Quarz aufgetragen. Bei Erstem verteilt man 5 µl der Polymerlösung auf dem Quarz und spinnst bei 3000 rpm ab. Bei Zweitem verteilt man das Polymer auf dem Quarz ohne zu spinnen, wobei man beim Spincoating dünnere Schichten erhält. Bei beiden Techniken drückt man anschließend den Stempel in das Polymer und fixiert mit einer Klammer. Die gleichmäßige Verteilung des Polymers ist wichtig, da bei ungleichmäßiger Auftragung der Quarz stärker gedämpft ist. Man erhält eine Schichtdicke von etwa 100 – 200 nm. Diese wird bestimmt, indem man die Frequenz des Quarzes vor und nach Auftragung der Polymerschicht misst. Ein Frequenzunterschied von 1 kHz entspricht etwa einer Schichtdickenerhöhung von 40 nm. Dann wird der Stempel mit den Partikeln darauf gedrückt. So entsteht in dem Polymer ein Abdruck der Partikel, und somit im Falle der geprägten Partikel ein künstlicher Antikörper in Form der Immunglobuline. Man lässt über Nacht aushärten und nimmt den Stempel ab. Da die Partikel sehr gut auf dem Glas haften, lösen sie sich beim Abheben des Stempels mit ab. Den Erfolg der Prägung kann man mittels AFM überprüfen.

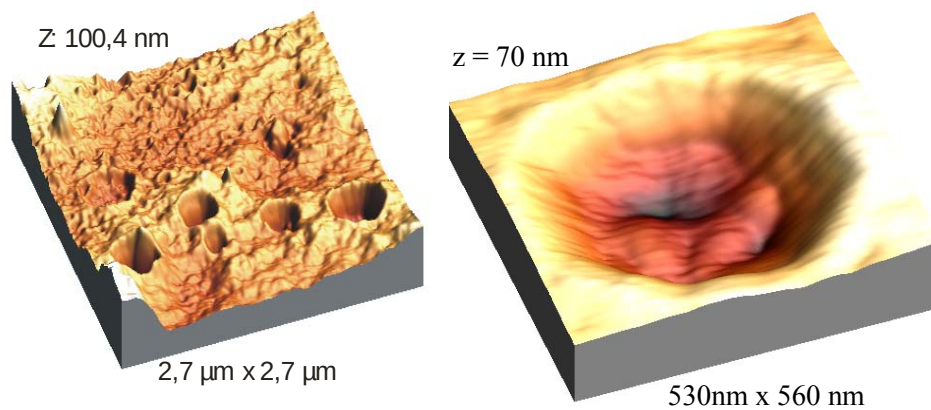


Abb. 33: AFM-Aufnahme der geprägten Schicht und einzelnes Imprint mit einer erhöhten Struktur die vielleicht eine Antikörperstruktur sein könnte

Mittels AFM wurde gezeigt, dass die Partikel auf der Polymeroberfläche Imprints hinterlassen, die Geometrie wird also übertragen. Viel wichtiger ist aber, ob auch Information auf molekularer Ebene übertragen wird, was in den folgenden Versuchen gezeigt wurde.

Messen des Effektes mit Rhinoviren

Um zu überprüfen, ob es neben der Geometrie auch zu einem chemischen Fit kommt, misst man die Bindung der Antigene. Dazu wird geprüft, ob die künstlichen Antikörper Rhinoviren so wie die natürlichen Immunglobuline binden. Dazu integriert man den Quarz, wie oben beschrieben, in die Messzelle und misst die Einlagerung der Rhinoviren.

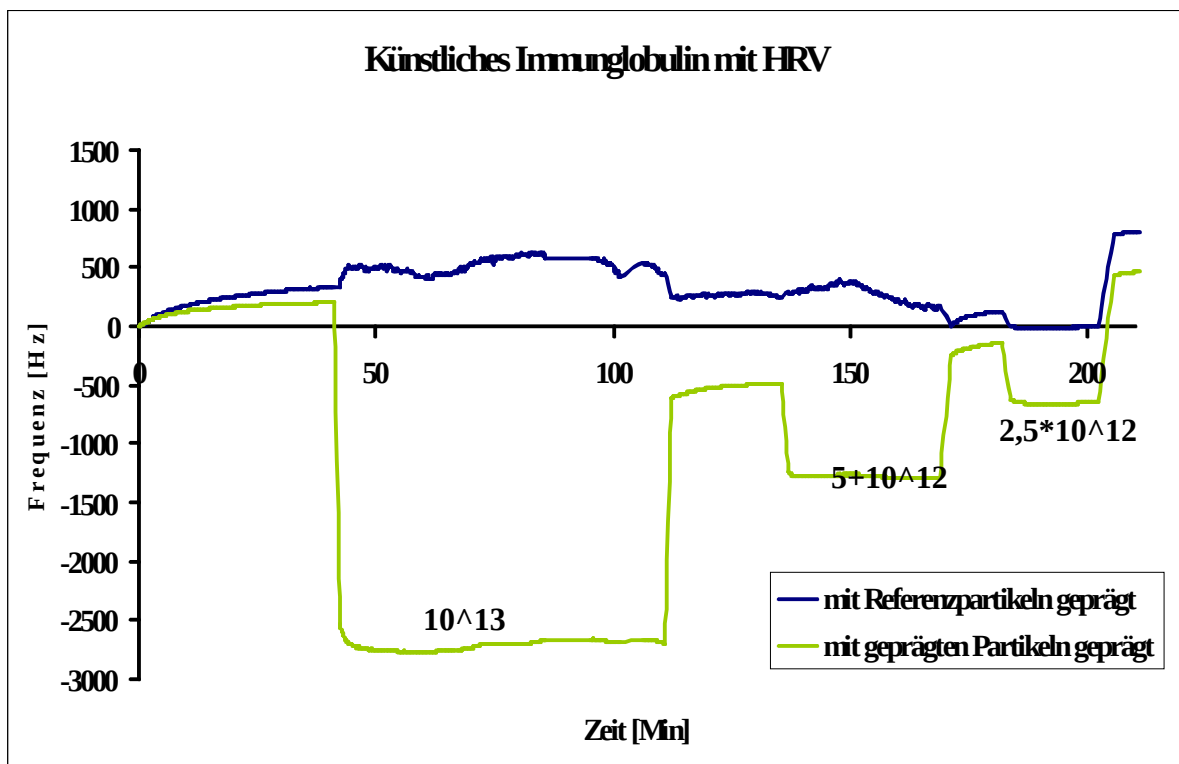


Abb. 34: QMB-Messung (geprägt mit Partikeln, die mit menschlichen Immunglobulinen geprägt wurden) der Konzentrationsabhängigkeit des Messeffektes mit HRV: Es wurden abwechselnd Wasser und Viren in Wasser in verschiedenen Konzentrationen eingespritzt und im stopped flow mode gemessen

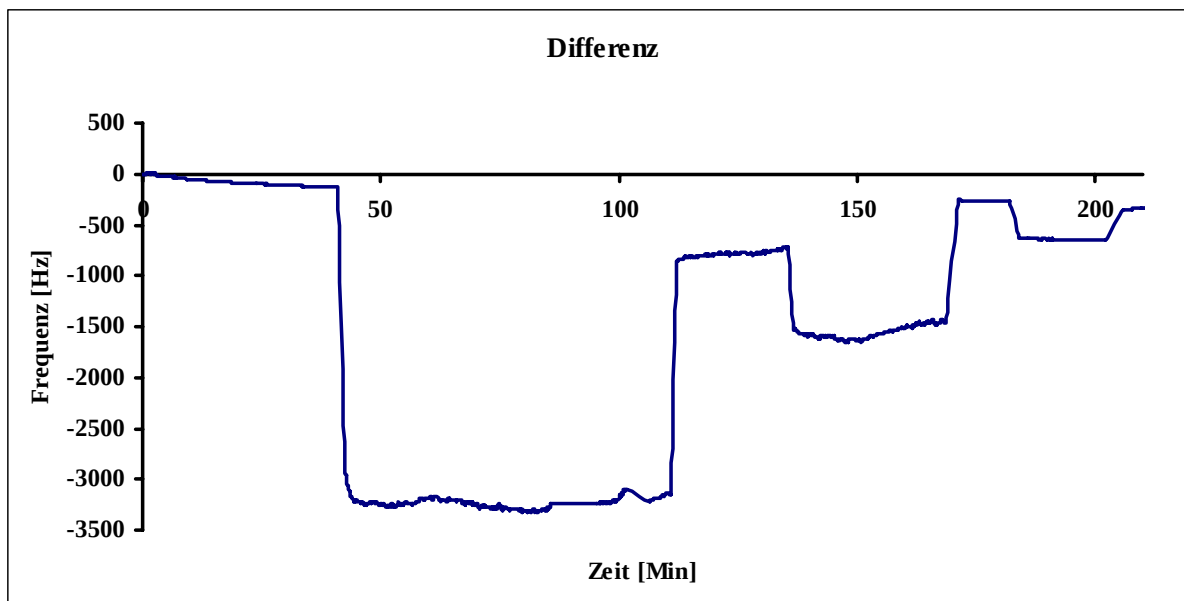


Abb. 35: Differenzmessung (geprägt mit Partikeln, die mit menschlichen Immunglobulinen geprägt wurden): Die Abbildung zeigt die Differenzkurve (geprägte minus Referenz) der Messung in Abb. 34

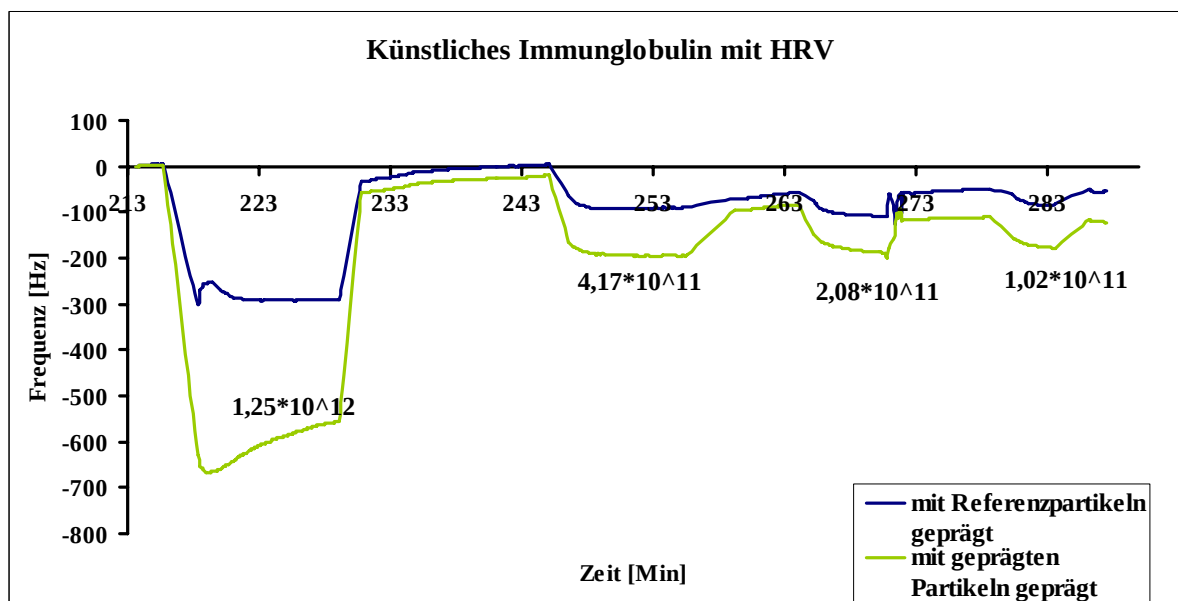


Abb. 36: QMB-Messung der Konzentrationsabhängigkeit des Messeffektes mit HRV (geprägt mit Partikeln, die mit menschlichen Immunglobulinen geprägt wurden): Fortsetzung der Messung in Abb. 34 mit niedrigeren Konzentrationen

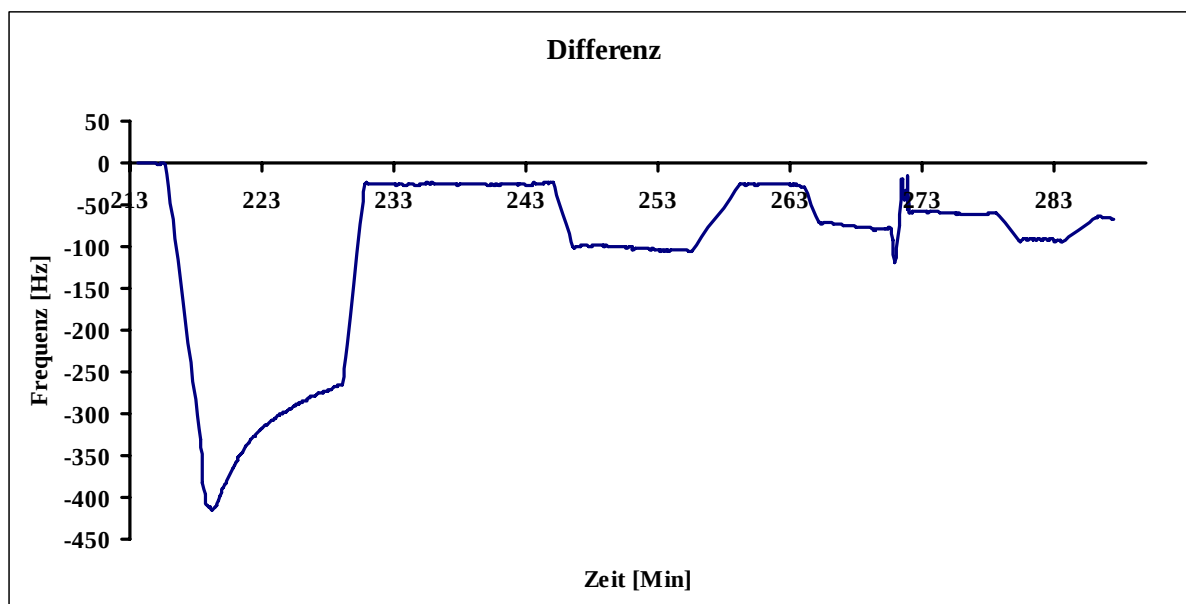


Abb. 37: Differenzmessung (Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon Copolymer geprägt mit Partikeln, die mit menschlichen Immunglobulinen geprägt wurden, zum Messen von HRV): Die Abbildung zeigt die Differenzkurve (geprägte minus Referenz) der Messung in Abb. 36

Die Messkurven (Abb. 34, Abb. 35, Abb. 36 und Abb. 37) zeigen, dass die Frequenzabnahme von der Konzentration abhängt. Die starke Abnahme der Frequenz gefolgt von einer Gleichgewichtseinstellung bei einer höheren Frequenz, die bei der Injektion von $1,25 \cdot 10^{12}$ Partikeln/l auftritt, wird häufig beobachtet. Dies ist vermutlich auf geringfügige Temperaturunterschiede der Lösung und des Wassers sowie durch Strömung und damit Druckunterschiede beim Injizieren zurückzuführen.

Konzentration [Partikel/ml]	Effekt Ref. [Hz]	Effekt gep. [Hz]	Effekt Diff. [Hz]
1E+13	440	-2768	-3208
5,00E+12	150	-1270	-1420
2,50E+12	-16	-655	-639
1,25E+12	-290	-557	-267
4,17E+11	-90	-195	-105
2,08E+11	-110	-190	-80
1,02E+11	-85	-178	-93

Tabelle 3: Konzentrationsabhängigkeit des Messeffektes mit Rhinoviren

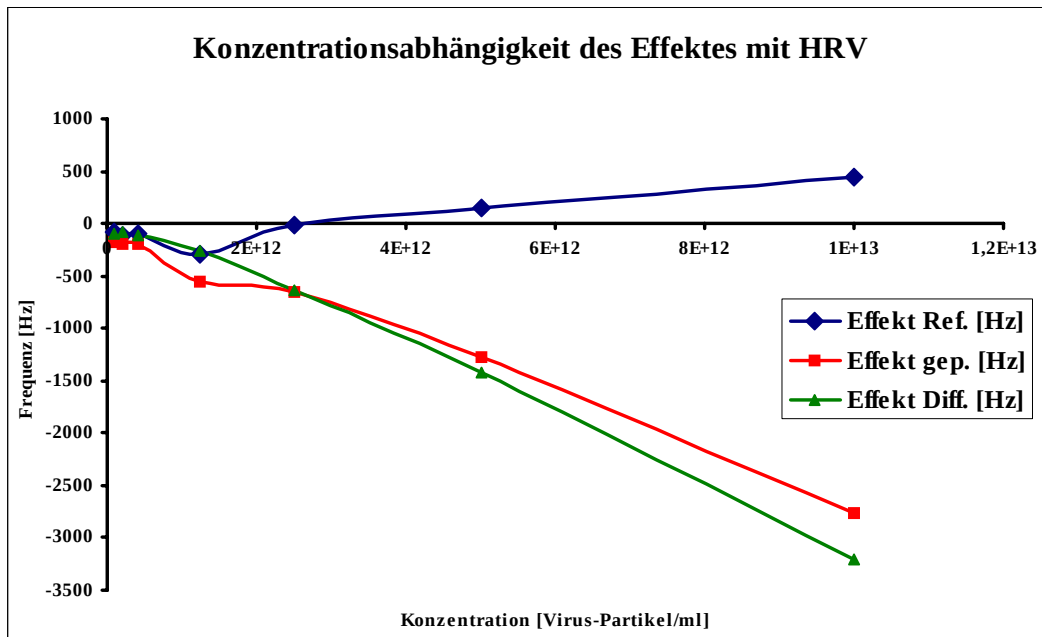


Abb. 38: Zusammenfassung der Konzentrationsabhängigkeit des Messeffektes von verschiedenen Konzentrationen von HRV gemessen mit einer Schicht aus Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon Copolymer geprägt mit Partikeln, die mit menschlichen Immunglobulinen geprägt sind.

Es konnte gezeigt werden, dass die Messeffekte reversibel sind. Dazu wurde eine Konzentration mehrmals eingespritzt.

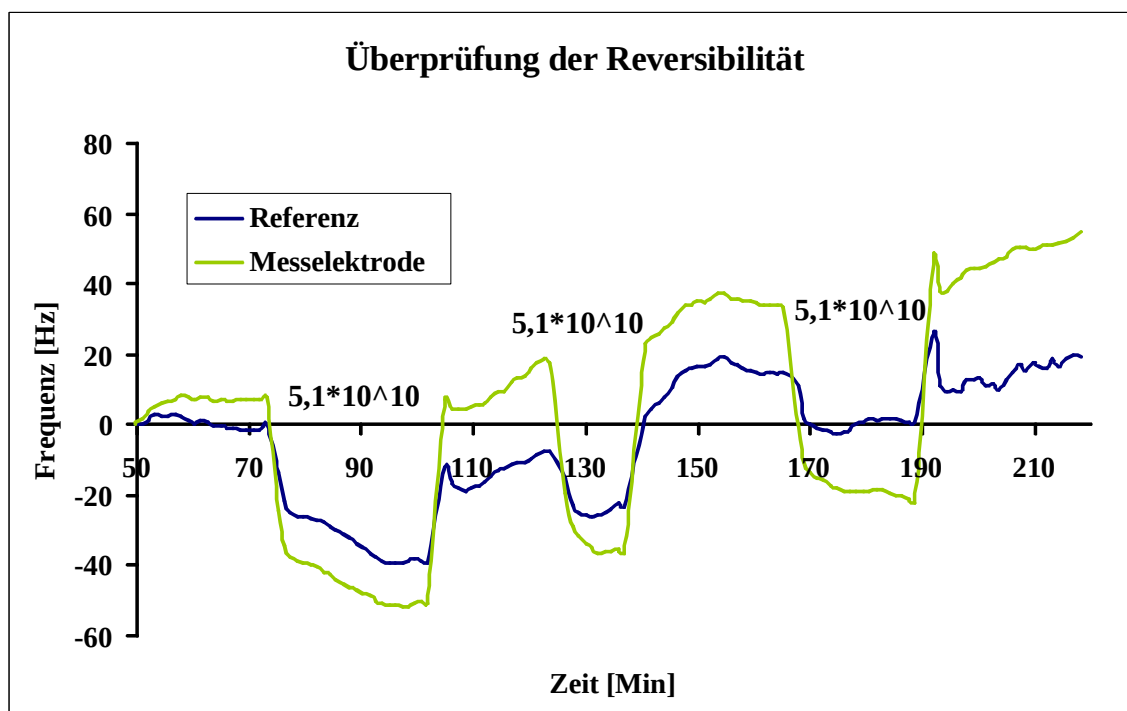


Abb. 39: QMB-Messung zur Überprüfung der Reversibilität, gemessen mit einer Schicht aus Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit menschlichen Immunglobulinen geprägt sind: Man injiziert abwechselnd Wasser und $5,1 \cdot 10^{10}$ Partikel/ml.

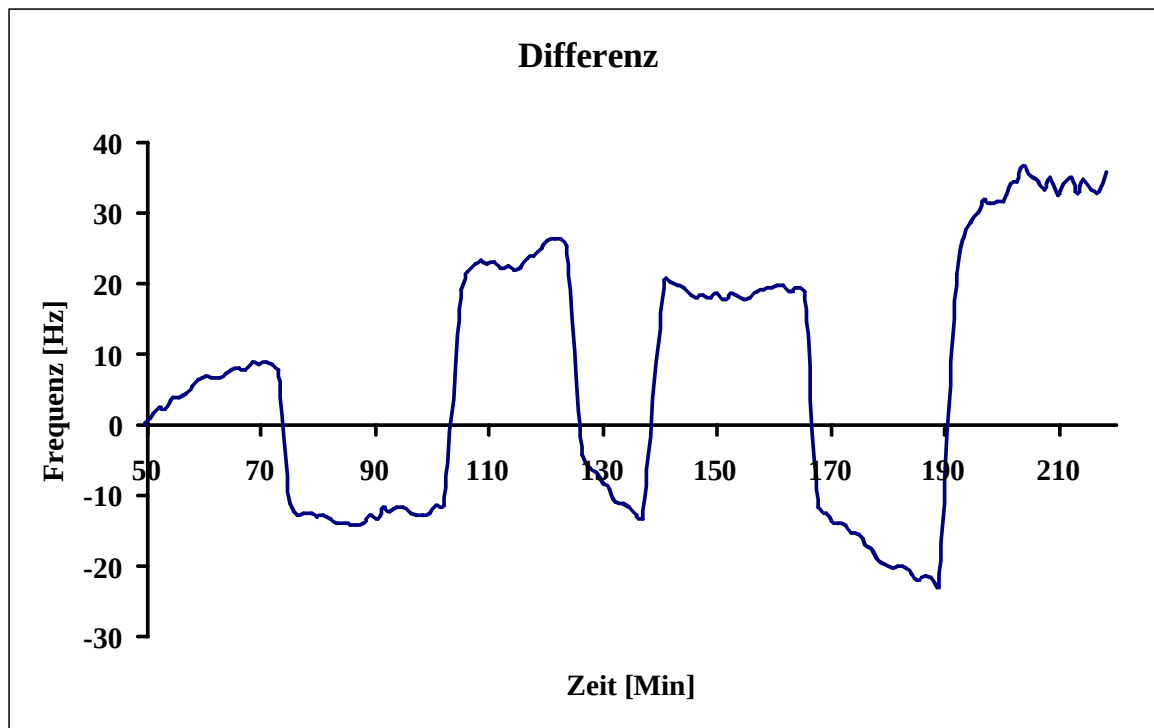


Abb. 40: Differenzkurve (Messelektrode – Referenz; Polyacrylsäure-Polyvinylpyrrolidon Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit menschlichen Immunglobulinen geprägt sind) der Messung in Abb. 39

Es konnte gezeigt werden, dass die künstlichen Antikörper, wie die natürlichen Rhinoviren binden, was darauf hindeutet, dass es tatsächlich auch zu einer Übertragung der chemischen Information durch den Prägeprozess gekommen ist.

Messungen von Querselektivitäten

In einem weiteren Schritt wurde die Selektivität der Prägung verifiziert, dass es also durch die Prägung neben dem geometrischen Fit (gezeigt mittels AFM siehe Abb. 33) auch zu einem chemischen Fit kommt. Dazu misst man zuerst mit einer Lösung von MKSV. Da der MKSV wie der Rhinovirus sphärisch ist und mit 25 nm⁵⁰ eine ähnliche Größe besitzt wie der 30 nm⁵¹ große HRV, eignet er sich, um den chemischen Fit zu zeigen.

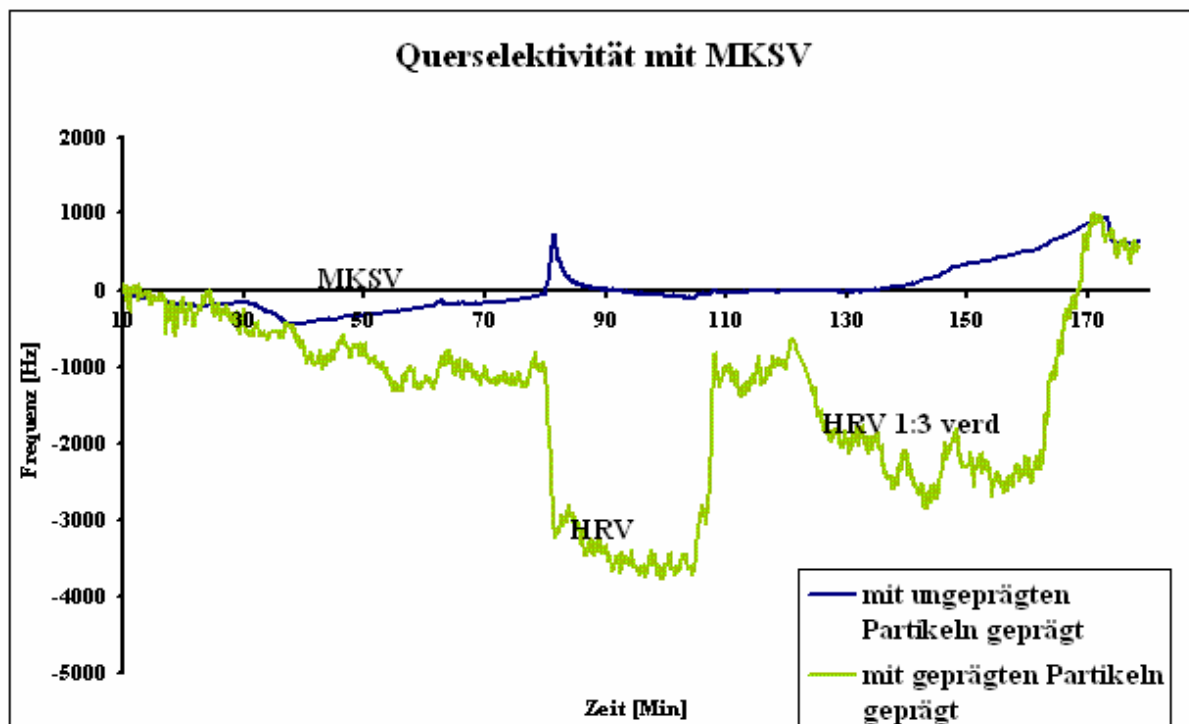


Abb. 41: Querempfindlichkeit (gemessen mit einer Schicht aus Polyacrylsäure/ Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln die mit menschlichen Immunglobulinen geprägt sind). Injektionsreihenfolge: Wasser - MKSV in Lösung (es erfolgte praktisch keine Frequenzänderung) - Wasser - HRV - Wasser - HRV (1:3 verdünnt)

Wie die nativen reagieren auch die künstlichen menschlichen Antikörper mit dem Rhinovirus, nicht aber mit dem MKSV. Das belegt den Erfolg der Prägung. Es kommt also nicht nur zu einem geometrischen, sondern auch zu einem chemischen Fit, der vermutlich durch eine Vielzahl schwacher Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen oder Van der Waals Kräfte) zustande kommt. Zur Überprüfung der Sensorgüte wurde noch in verschiedenen Matrices gemessen. Als einfache Matrix wurde eine Lösung mit MKSV im Überschuss ($5 \cdot 10^{13}$ Partikel/ml) und als etwas komplexere Matrix eine Lösung des Proteinverdau Pepton verwendet. Man misst die Lösungen jeweils mit und ohne Virus und beobachtet die spezifische Frequenzänderung.

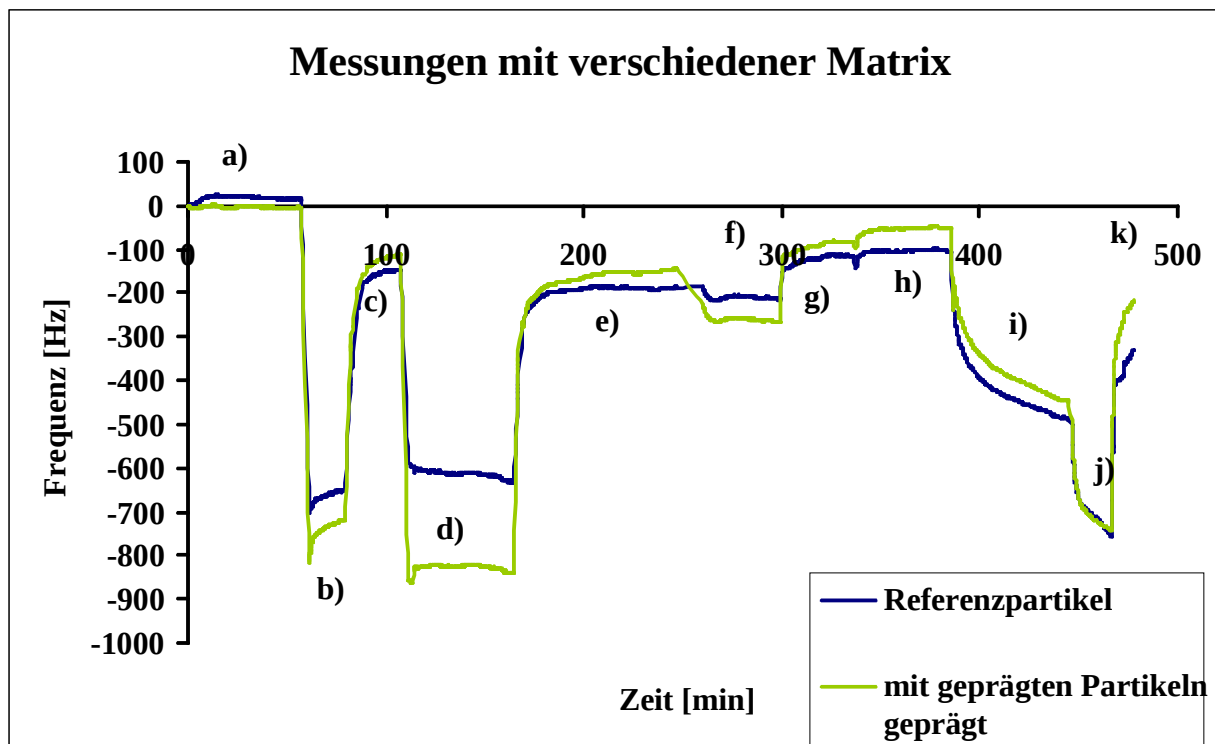


Abb. 42: QMB-Messung mit verschiedenen Matrices (gemessen mit einer Schicht aus Polyacrylsäure/ Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit menschlichen Immunglobulinen geprägt sind): a) Wasser b) Lösung mit MKSV in Puffer (20 mM TRIS) c) Wasser d) Mischung MKSV ($5 \cdot 10^{13}$ Partikel/ml) +HRV ($1,6 \cdot 10^{12}$ Part./ml) e) Wasser f) $4,17 \cdot 10^{11}$ Part./ml HRV in Wasser g) Wasser h) 0,02 mg/ml Pepton in Wasser i) 0,2mg/ml Pepton in Wasser j) 0,2mg/ml Pepton + $4,17 \cdot 10^{11}$ Part./ml HRV in Wasser k) Wasser

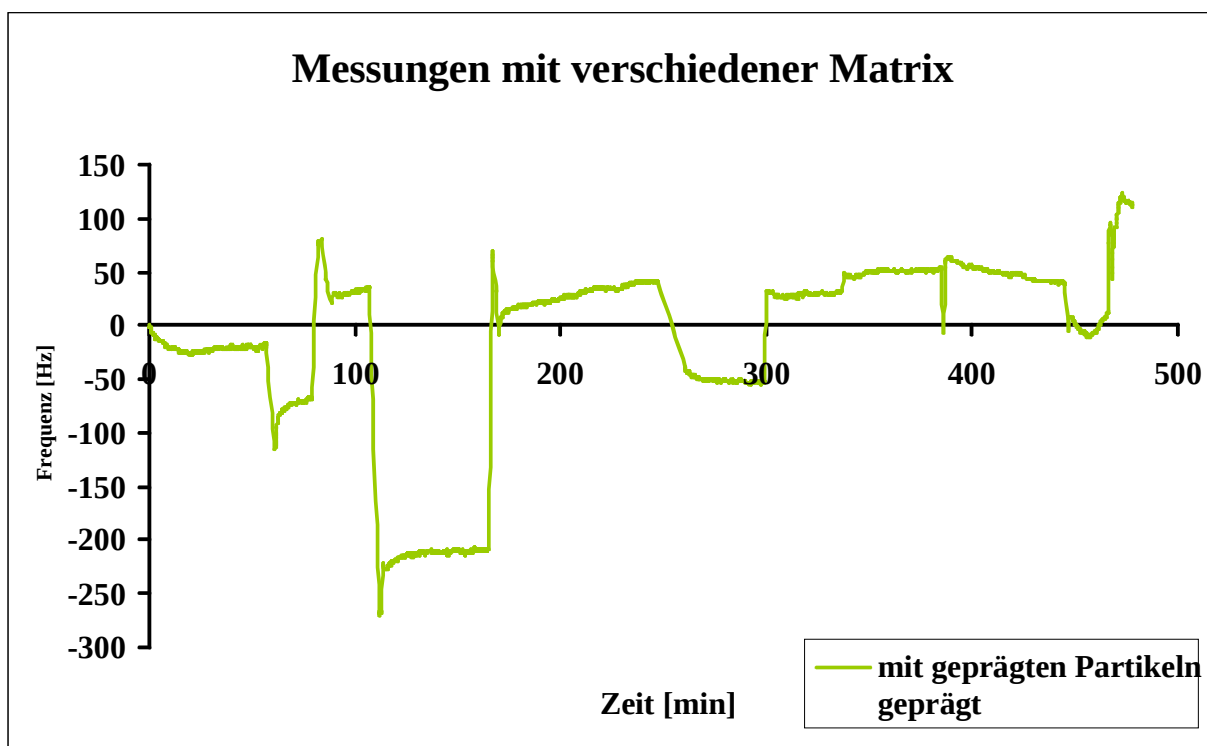


Abb. 43: Differenzmessung der Messkurve in Abb. 42 (geprägte minus Referenz)

Wenn man den Puffer ändert oder mit hohen Konzentrationen eines Fremdanalyten misst, bekommt man große unspezifische Messeffekte. Diese treten aber auch auf der Referenz auf und man kann sie abziehen. Bei der Messung wurden für die Oberseite des Quarzes Elektroden mit einem Durchmesser von 5 mm verwendet. Der Durchmesser der Elektroden auf der Unterseite betrug 4 mm. Wählt man für die Elektroden auf der Unterseite einen Durchmesser von nur 3 mm (also einen größeren Unterschied der beiden Durchmesser), so erhält man geringere Ionenstärkeeffekte.

Matrix	Konz. des HRV	Effekte	Effekte Wasser
in MKSV	1,60E+12	210	215
in Wasser	4,17E+11	95	95
in Pepton	4,17E+11	45	95

Tabelle 4: Messeffekte mit Rhinoviren in verschiedenen Matrices

In der

Tabelle 4 sind die gemessenen Frequenzänderungen nochmals zusammengestellt. Darin sind die Sensorantworten in der komplexen Matrix, denen in Wasser gegenüber gestellt. Man ersieht daraus, dass auch bei einem Überschuss an MKSV praktisch der gleiche Effekt gemessen wird. In der Pepton-Lösung misst man einen deutlich geringeren Effekt als in Wasser. Dies könnte daran liegen, dass sich die im Überschuss vorhandenen Peptide an die Schicht oder die Viren anlagern und daraus ein kleinerer spezifischer Effekt resultiert. Trotzdem bekommt man eine selektive Sensorantwort. Weiters wurde versucht, Viren in einer verdünnten Blutprobe nachzuweisen. Um nicht zu viele Erythrocyten in der Probe zu haben, wurde die Blutprobe 5 min bei 1500rpm abzentrifugiert. Dazu misst man zuerst die 1:1 verdünnte Blutprobe ohne Viren und dann mit Viren.

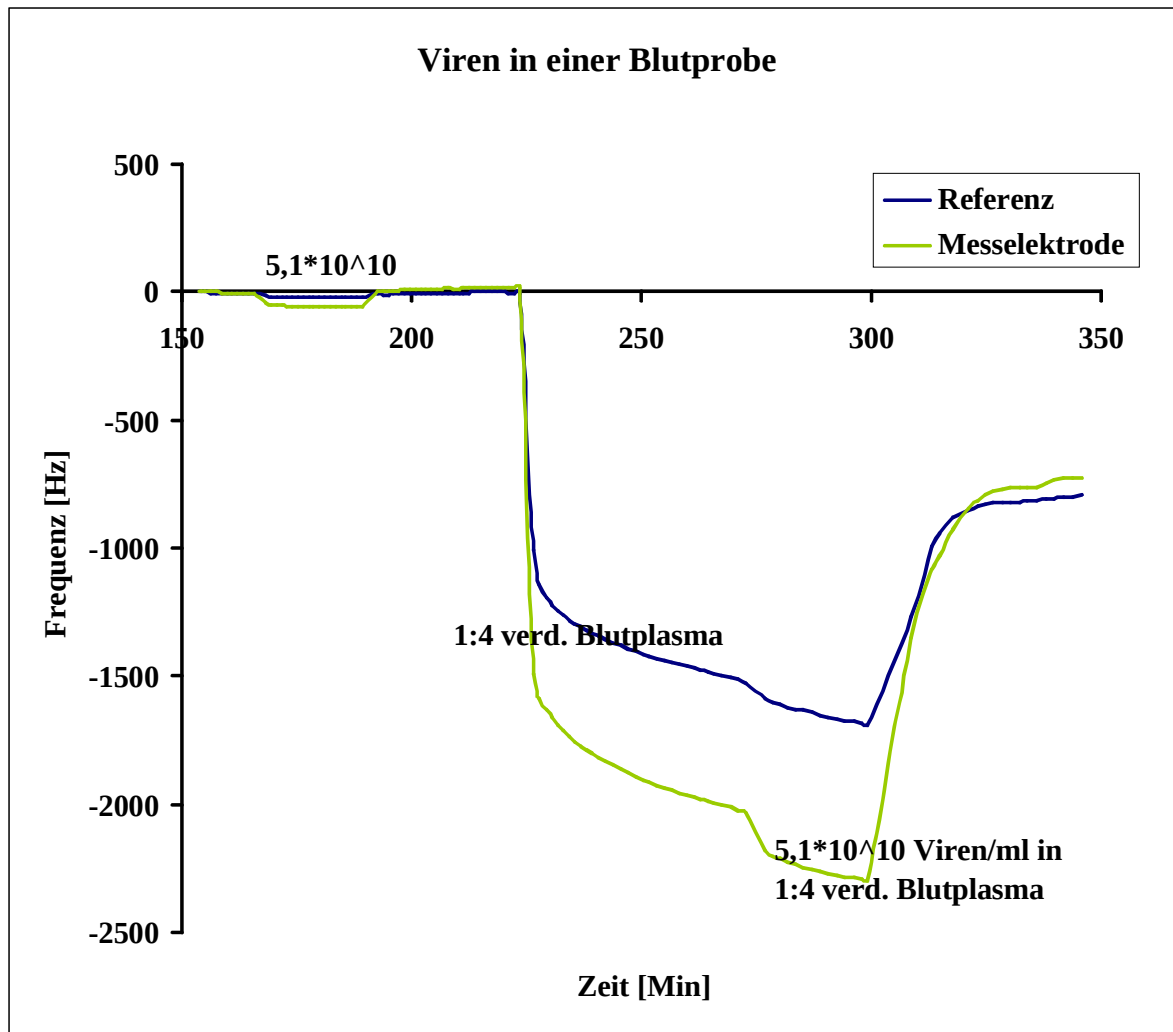


Abb. 44: QMB-Messung der Viren in einer verdünnten Blutprobe (gemessen mit einer Schicht aus Polyacrylsäure/ Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit menschlichen Immunglobulinen geprägt sind). Injektionsreihenfolge: Wasser - Virenlösung (5,1*10¹⁰ Viren/ml) - Wasser - Blutprobe - Blutprobe mit Virenlösung (5,1*10¹⁰ Viren/ml)

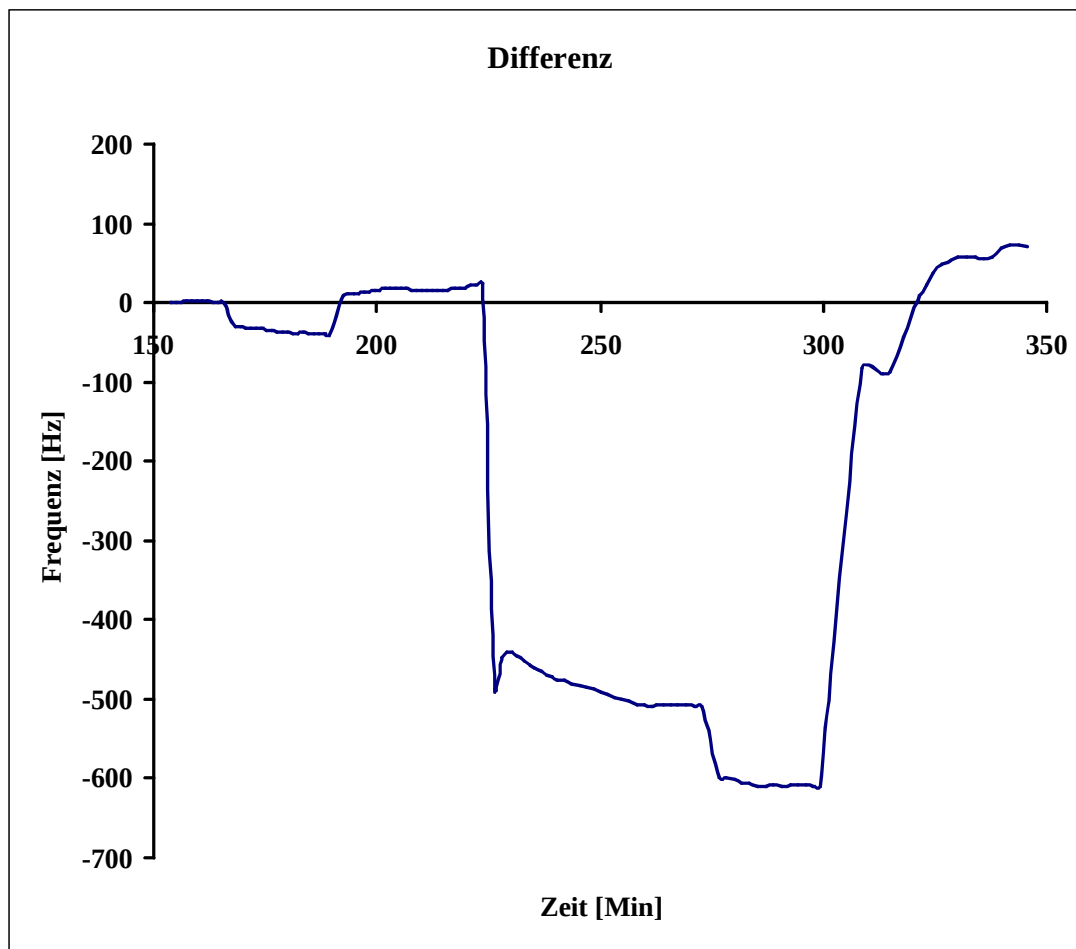


Abb. 45: Differenzmessung der in Abb. 44 gezeigten Messkurve

Das Einspritzen der Blutprobe bewirkt einen relativ großen unspezifischen Effekt, da die Blutprobe mit einem Puffer (mit EDTA stabilisierter Citratpuffer) stabilisiert ist. Außerdem gibt es noch einen relativ großen Effekt, der nur auf der Messelektrode auftritt. Dieser kommt wahrscheinlich daher, dass der eingesetzte natürliche Antikörper eine Mischung aus IgGs mit verschiedenen Antigenen ist (aus Plasma gewonnen), die auch mit Plasmaproteinen reagieren können. Der Messeffekt nach Zugabe der Virussuspension in der Blutprobe ist mit etwa 100 Hz ungefähr doppelt so groß wie in Wasser. Dies könnte daran liegen, dass sich zusätzlich an die eingelagerten Viren noch andere Verbindungen anlagern oder einfach durch die Änderung der Dielektrizitätskonstante der Lösung die Feldlinien ändern und damit der Messeffekt anders ist. Der Virus lässt sich aber trotzdem in einer recht komplizierten (und im Detail nicht bekannten), realen Matrix nachweisen.

Vergleich der natürlichen Antikörper mit der Antikörper-Replika

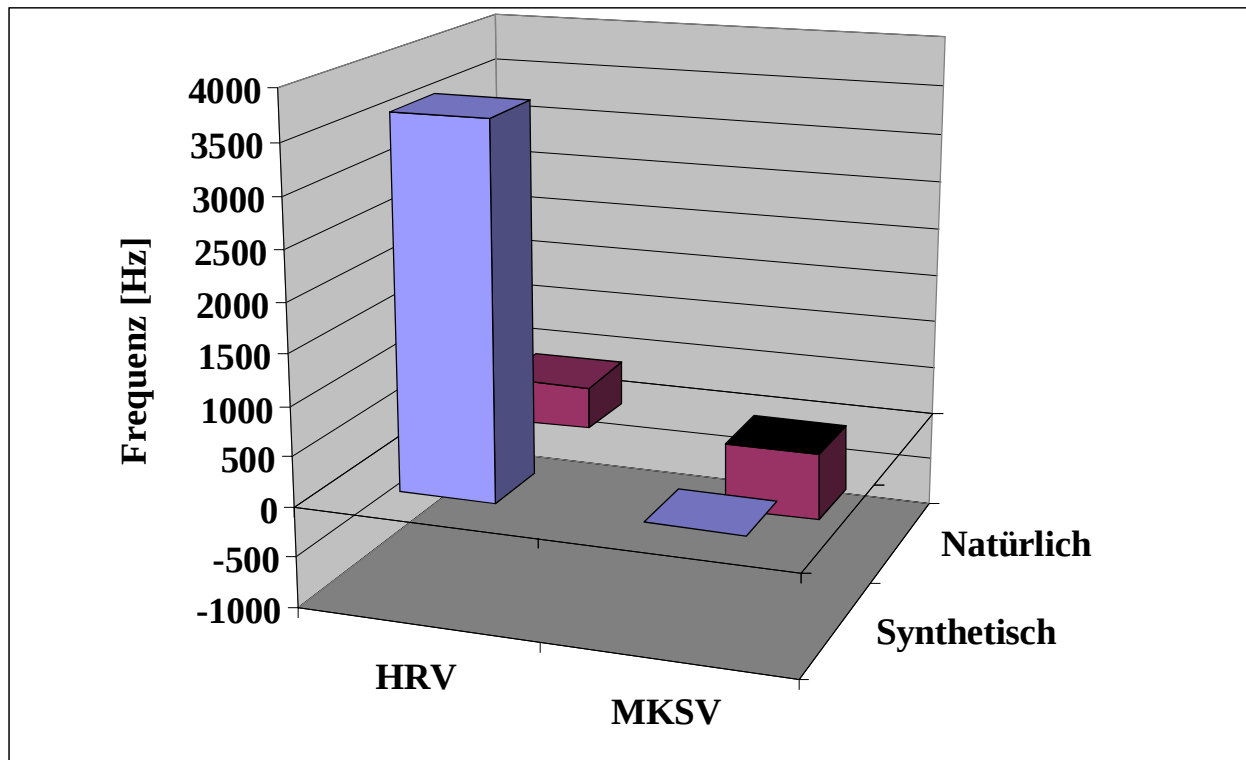


Abb. 46: Vergleich der Messeffekte der künstlichen (Replika der menschlichen IgG) und natürlichen Antikörper

Im Balkendiagramm ist nochmals ein Vergleich der Messeffekte von synthetischen und natürlichen Immunglobulinen dargestellt. Darin sieht man, dass das künstliche Immunglobulin keinen, das natürliche Immunglobulin sogar einen positiven Effekt mit dem MKSV ergibt, wohingegen der HRV sehr selektiv eingelagert wird. Dabei konnte mit dem künstlichen Immunglobulin eine noch viel größere Frequenzänderung erreicht werden. Der Grund liegt darin, dass bei den künstlichen Antikörpern durch den Prägeprozess eine größere Oberfläche geschaffen wird, die eine höhere Zahl an Andockstellen anbietet als die natürlichen Antikörper (natürliche bilden eine Monolage, haben also nur die Elektrodenoberfläche zur Verfügung).

Künstliche Immunglobuline zur Detektion von anderen Immunglobulinen

Es wurden Sensoren zur Detektion von Immunglobulinen hergestellt. Dazu wurden künstliche Antikörper aus Polymer verwendet. In einem ersten Test wurde ermittelt, ob die natürlichen Antikörper die Immunglobuline der anderen Organismen binden.

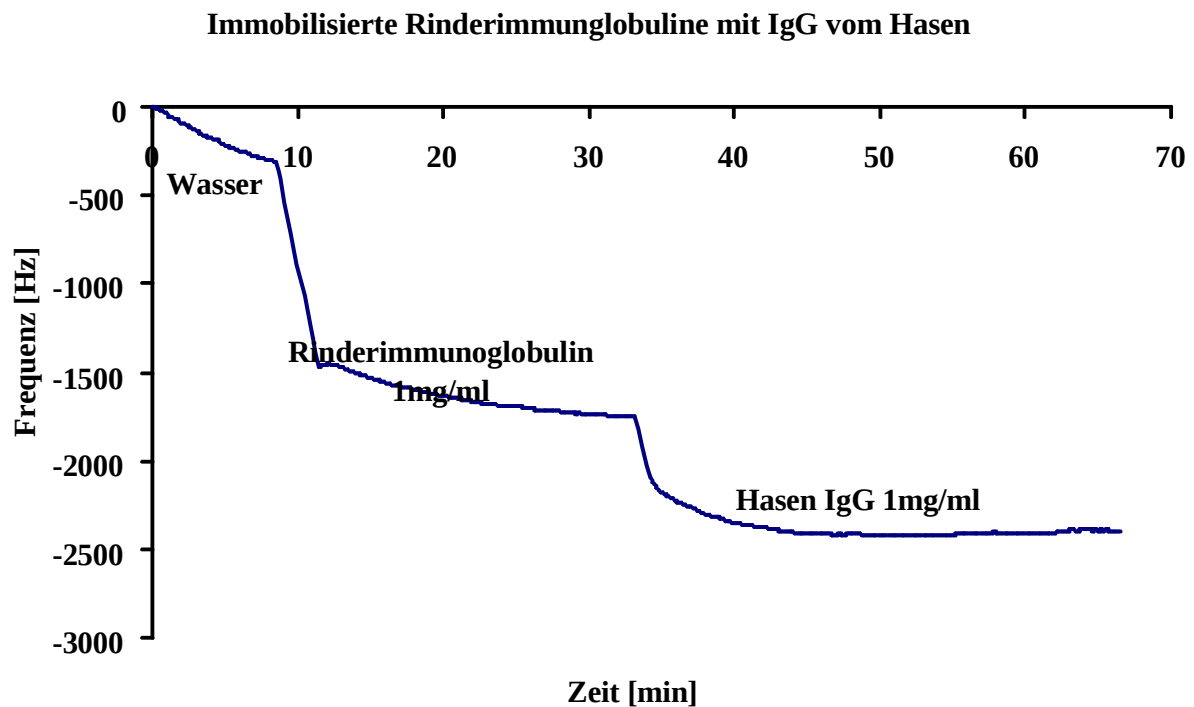


Abb. 47: QMB-Messung von immobilisierten Rinderimmunglobulinen auf einer nackten Goldoberfläche mit IgG vom Hasen

Natürliches IgG vom Hasen zum Messen von menschlichem IgG

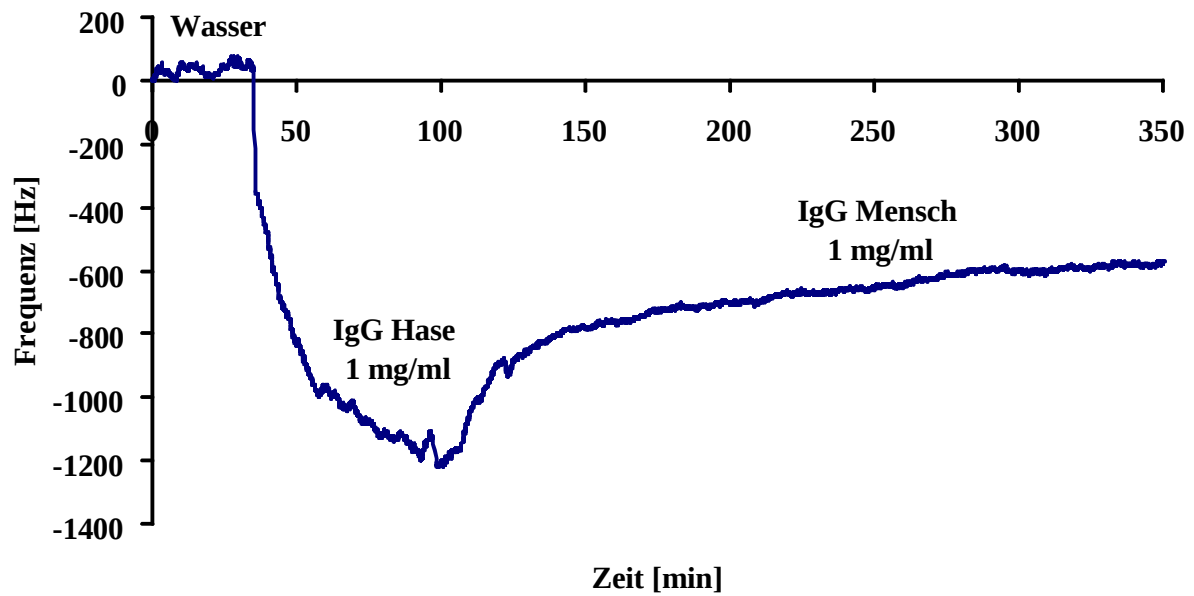


Abb. 48: QMB-Messung von immobilisierten Hasen IgG mit menschlichen Immunglobulinen

Immobilisierte IgG vom Hasen zum Messen von Rinderimmunglobulinen

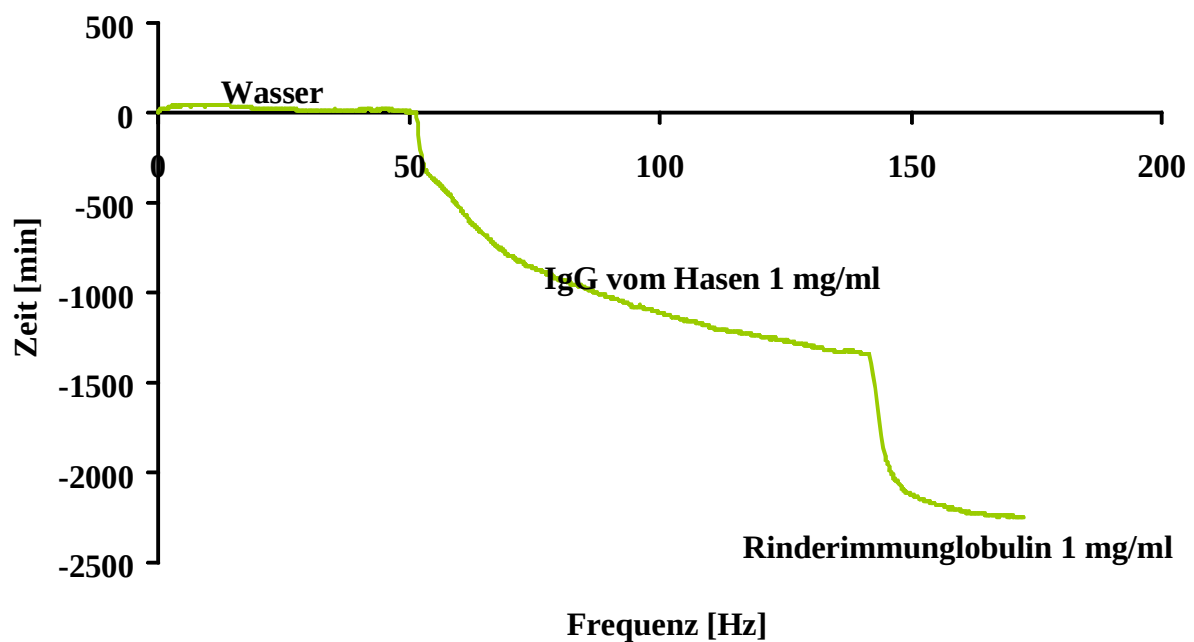


Abb. 49: QMB-Messung von immobilisierten IgG vom Hasen mit Rinderimmunglobulinen

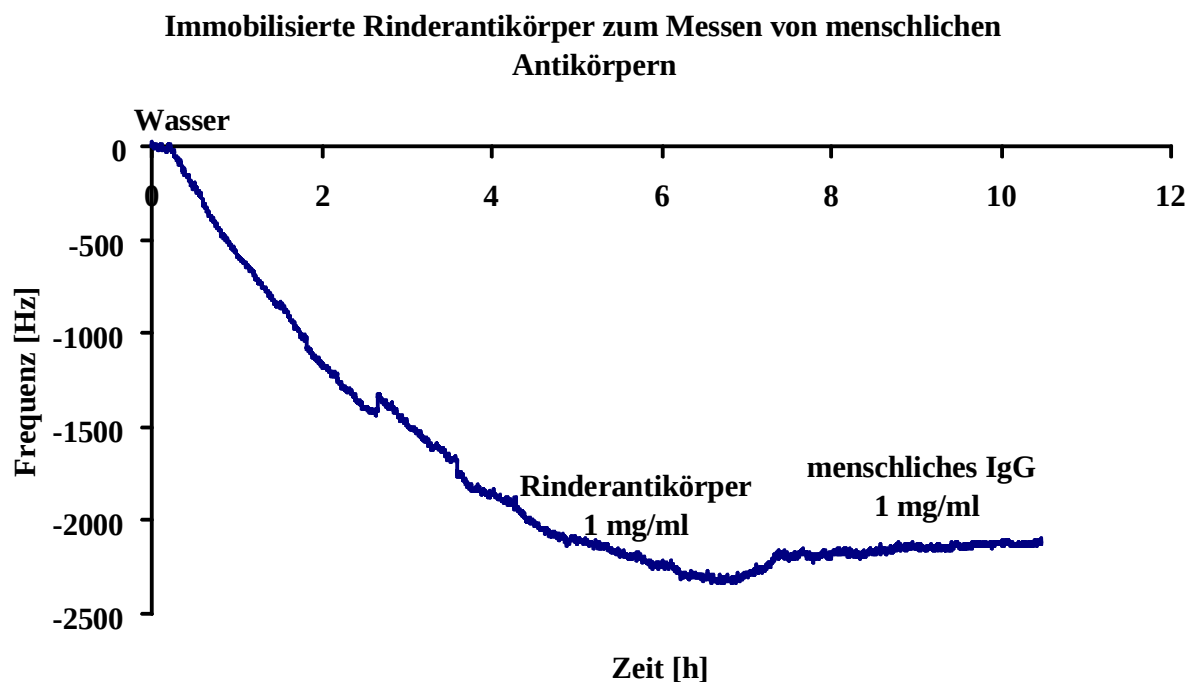


Abb. 50: QMB-Messung von auf einer nackten Goldoberfläche immobilisierten Rinderimmunglobulinen mit menschlichem IgG

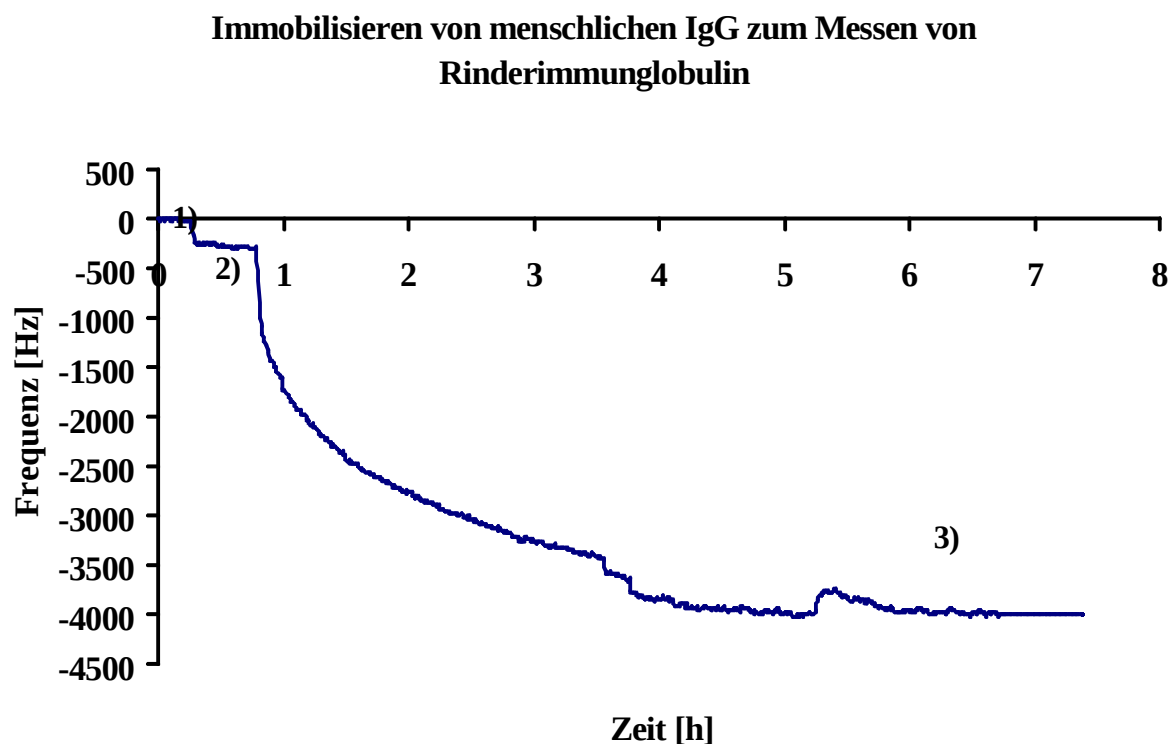


Abb. 51: QMB-Messung von Rinder-Immunglobulin auf immobilisierten (auf einer nackten Goldoberfläche) menschlichen Antikörpern: 1) zuerst wird Wasser injiziert. 2) Wenn die Frequenz konstant ist, gibt man die Lösung des menschlichen Immunglobulins (1 mg/ml) zu. 3) Wenn das Signal erneut konstant ist, gibt man den Rinderantikörper zu (1 mg/ml)

Wie aus Abb. 51 ersichtlich, bindet der menschliche Antikörper an das Rinder-Immunglobulin. Daher können auch die künstlichen Antikörper für die Detektion von Rinderimmunglobulin verwendet werden. Es wurde weiters untersucht, wo bei Adsorption des Antikörpers die Sättigung liegt. Dazu injiziert man den Antikörper so lange, bis sich kein weiterer Antikörper mehr anlagert, also die Frequenz nicht mehr abnimmt.

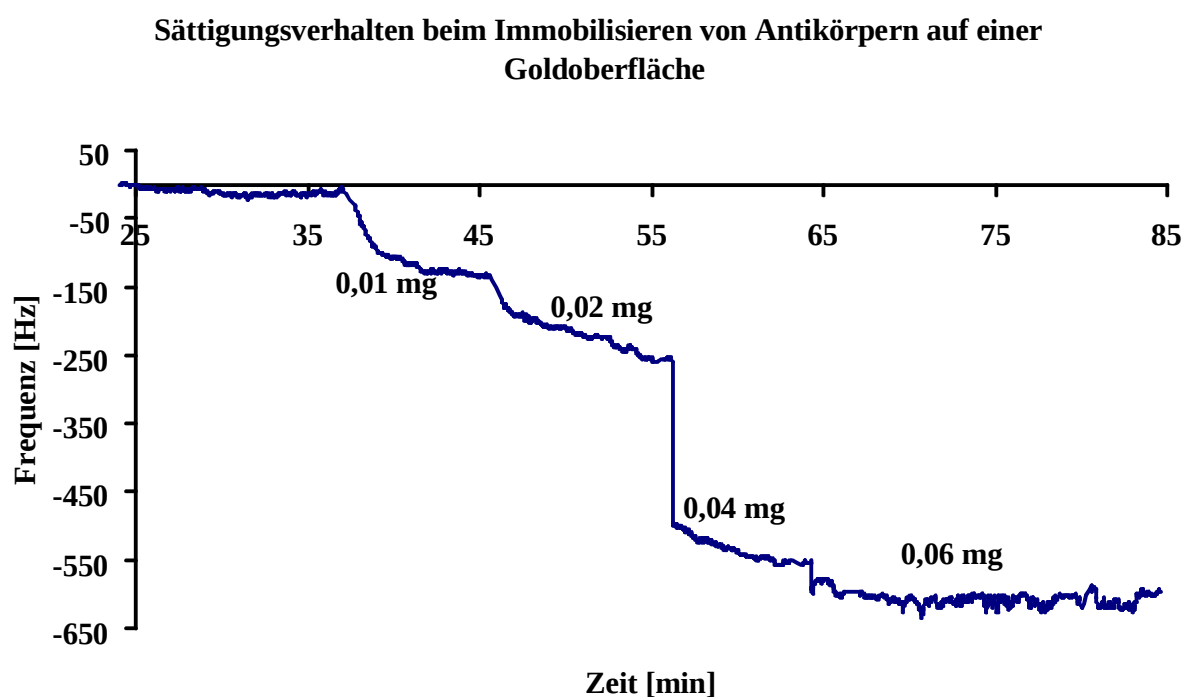


Abb. 52: QMB-Messung zur Überprüfung der Sättigung beim Anlagern an die Goldoberfläche. Die Konzentration an Immunglobulin wurde erhöht, bis sich die Frequenz nicht mehr änderte. Das Sättigungsverhalten ist in Abb. 53 dargestellt.

Messung des Sättigungsverhalten bei Immobilisierung von menschlichen Antikörpern

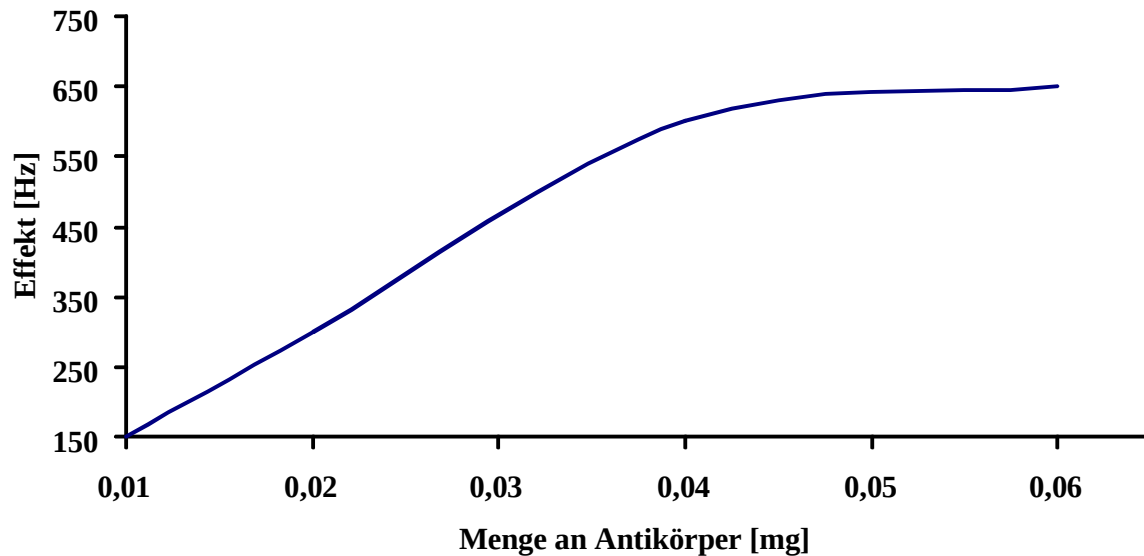


Abb. 53: Messung der Immobilisierung von menschlichem Immunglobulin auf einer nackten Goldoberfläche

Die Sättigung wurde bei etwa 0,06 mg und einem Messeffekt von 650 Hz erreicht.

Künstliche Antikörper mit Rinderimmunglobulin

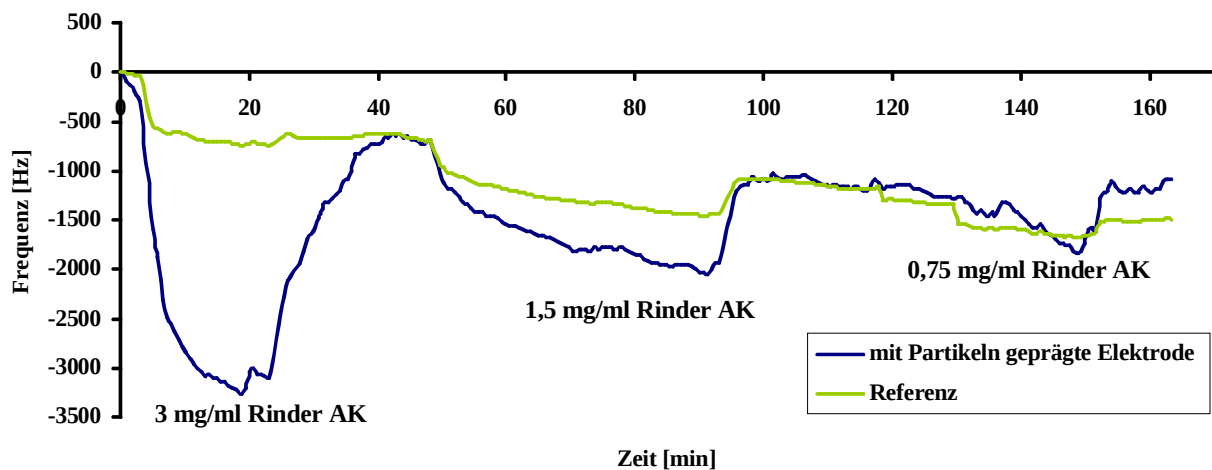


Abb. 54: QMB-Messung eines Quarzes mit (mit menschlichem Immunglobulin) geprägten Partikeln geprägten Elektrode als Messelektrode und eine mit ungeprägten Partikeln geprägte Referenzelektrode. Es wurden abwechselnd Lösungen des Rinderimmunglobulins mit verschiedenen Konzentrationen und Wasser injiziert.

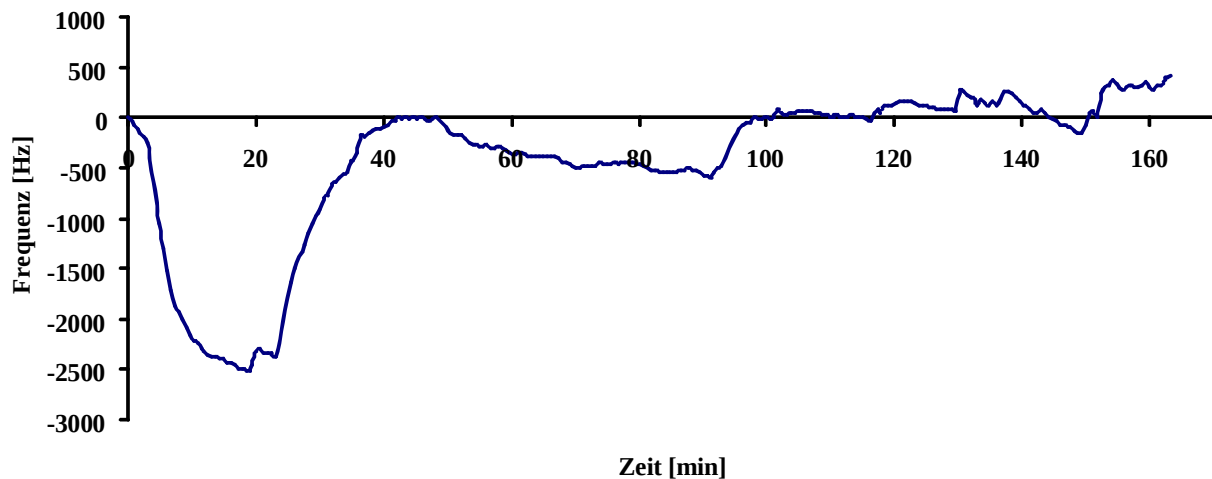


Abb. 55: Differenzmessung der Kurve in Abb. 54

Es wurde auch getestet, ob die natürlichen menschlichen Immunglobuline die Immunglobuline des Hasen binden.

Immobilisierte menschliche Immunglobuline mit Antikörpern vom Hasen

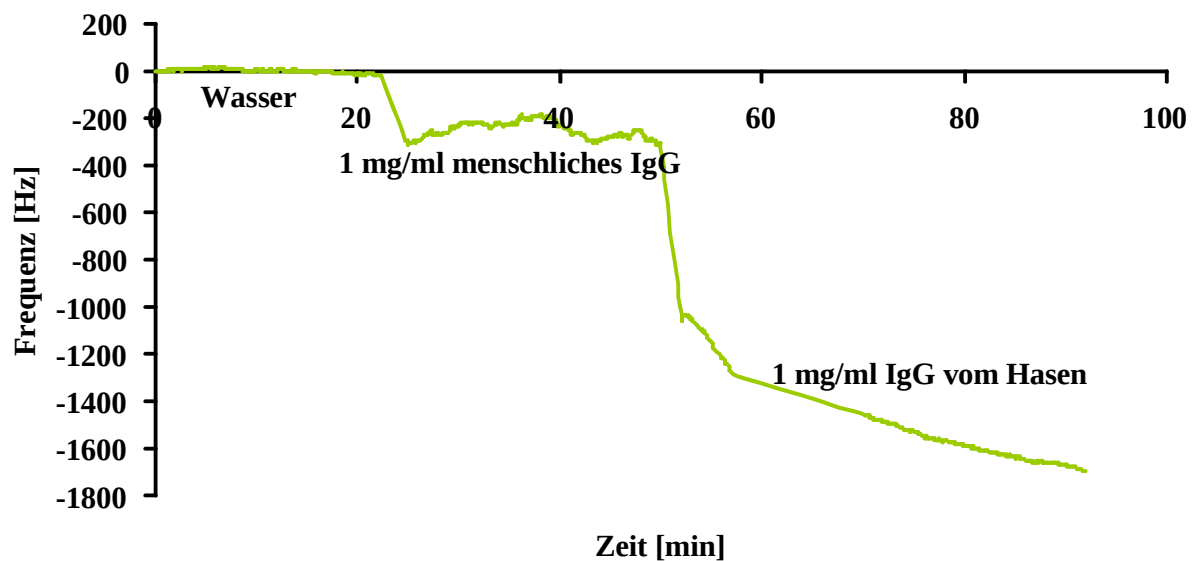


Abb. 56: QMB-Messung von Immunglobulin vom Hasen auf immobilisierten (auf einer nackten Goldoberfläche) menschlichen Antikörpern: zuerst wird Wasser injiziert. Wenn die Frequenz konstant ist, gibt man die Lösung des menschlichen Immunglobulins (1 mg/ml) zu. Wenn das Signal erneut konstant ist, gibt man den Antikörper vom Hasen zu (1 mg/ml)

Aus Abb. 56 ist ersichtlich, dass der Antikörper des Hasen von dem menschlichen Antikörper gebunden wird. Daher können auch die künstlichen Antikörper zur Detektion der Immunglobuline des Hasen verwendet werden.

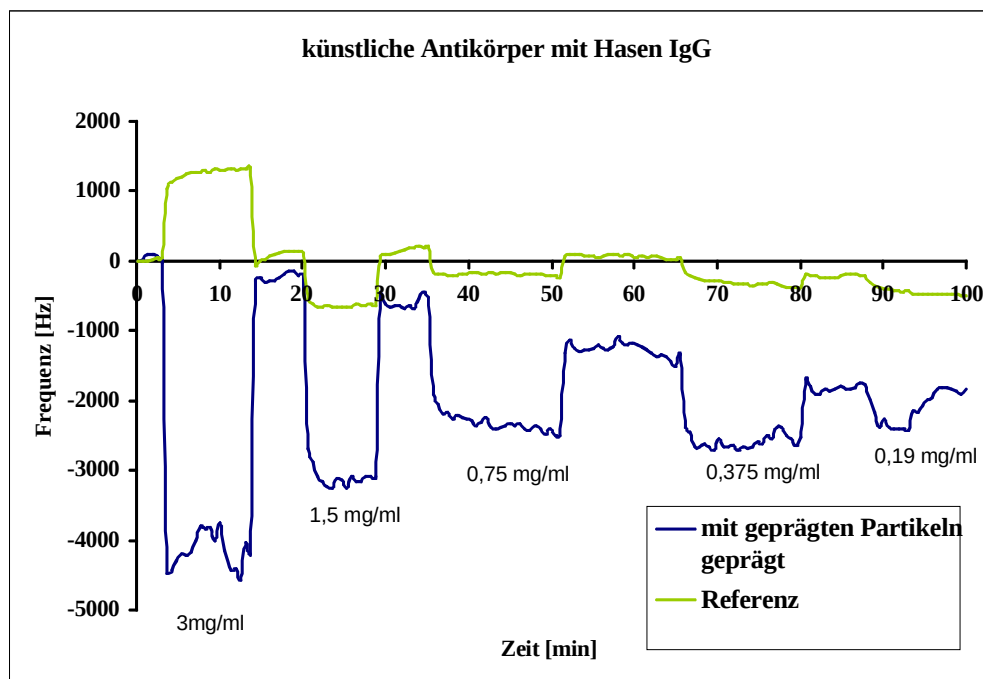


Abb. 57: QMB-Messung mit künstlichen Immunglobulinen (auf Polyacrylsäure-Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln die mit menschlichen Immunglobulinen geprägt sind): Man injiziert abwechselnd Wasser und verschiedene Konzentrationen des Immunglobulins vom Hasen, um die Abhängigkeit des Messeffektes von der Konzentration zu messen.

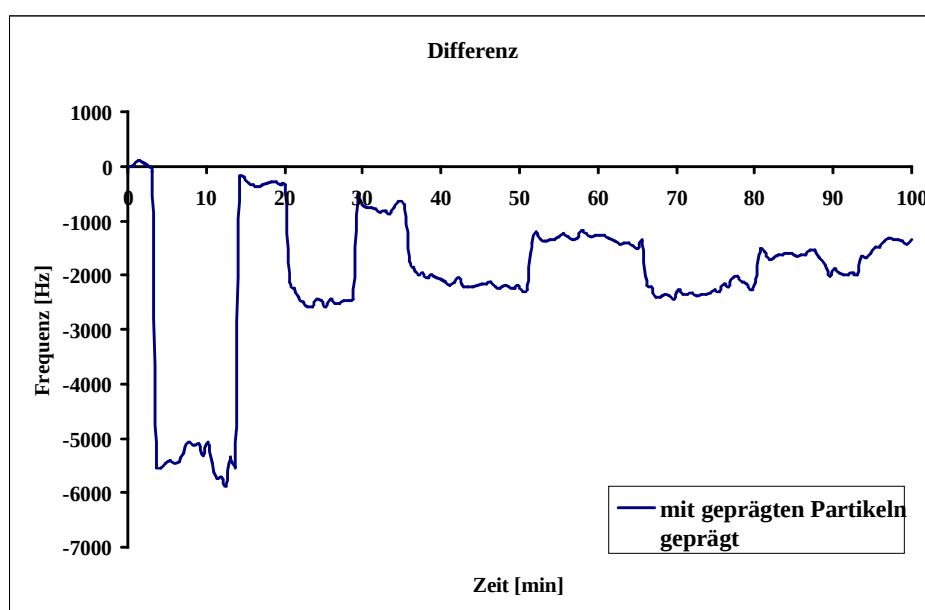


Abb. 58: Differenzkurve der in Abb. 57 gezeigten Messkurve

Man erhält eine Frequenzänderung, die abhängig ist von der Konzentration.

Konzentration [mg/ml]	Effekt Ref. [Hz]	Effekt gep. [Hz]	Effekt Diff. [Hz]
3	1289,4	-4415	-5704,4
1,5	-796	-2938	-2142
0,75	-380	-1982	-1602
0,375	-377	-1168	-791
0,19	-265	-655	-390

Tabelle 5: Gemessene Effekte (der Replika der menschlichen IgG) mit Immunglobulin vom Hasen

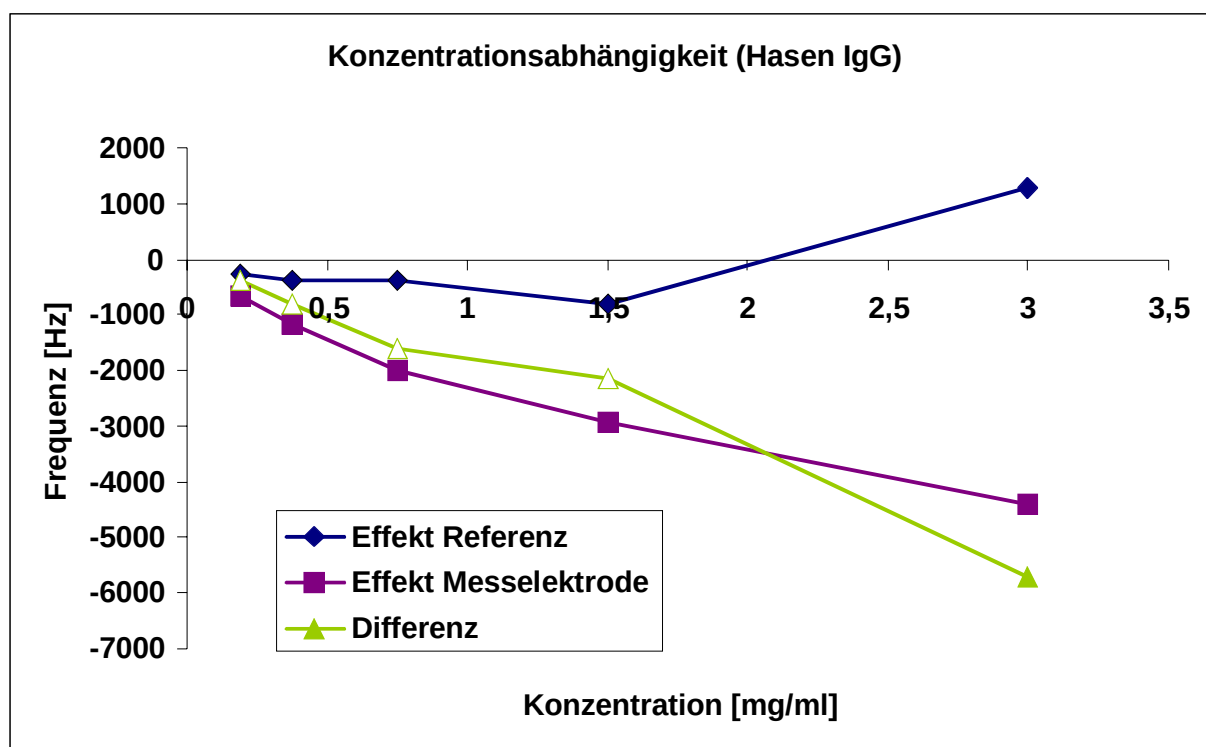


Abb. 59: Abhängigkeit der Frequenzänderung des Sensors von der Konzentration (auf Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit menschlichen Immunglobulinen geprägt sind)

Der positive Effekt (entgegen der Sauerbrey-Gleichung) auf der Referenzelektrode bei der höchsten Konzentration ist darauf zurückzuführen, dass beim Referenzpolymer keine feste Bindung erfolgt – es sind ja keine Bindungsstellen vorhanden. Feste Bindung an die Schicht und Rigidität des Materials sind allerdings Voraussetzung für ein Sauerbrey-Verhalten. Stattdessen kann sich der Analyt noch auf der Oberfläche bewegen, also „herumrollen“, was zu einem Antisauerbrey-Verhalten führt.⁵²

Zusammenfassung der Messung von Immunglobulinen mit anderen Immunglobulinen

Abb. 60 zeigt die Messeffekte der künstlichen und der natürlichen Immunglobuline im Vergleich. Wie man sieht, wird mehr vom Immunglobulin des Hasen als von dem des Rinds in die Polymerschicht eingelagert.

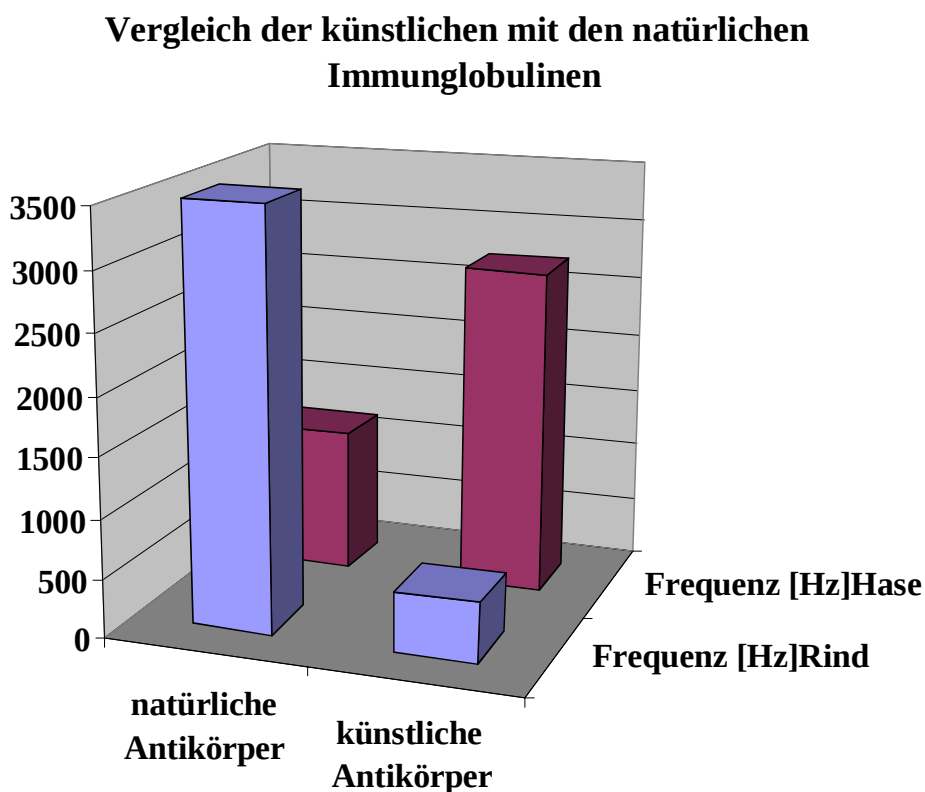


Abb. 60: Vergleich der Messeffekte der natürlichen Antikörper und der Antikörper-Replik (die natürlichen Antikörper sind immobilisierte menschliche Immunglobuline-G, die künstlichen bestehen aus Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit menschlichen Immunglobulinen geprägt wurden)

Detektion von Sesamproteinen

Natürliche Antikörper zur Detektion von Sesamproteinen

Sesam zählt zu den wichtigsten Allergenen in Lebensmitteln. Deshalb wurden Sensoren hergestellt, mit denen man Sesamproteine detektieren kann. Dazu stellt man zuerst einen Immunosensor her, der auf der Bindung von Immunglobulinen (gewonnen aus der Immunisierung von Hühnern und Gewinnung der IgY aus den Eiern) an ihr Antigen beruht. Man bringt zuerst mittels Siebdruck Elektroden aus Gold auf Quarzplättchen auf (siehe oben). Nach Aufbringen der Goldschicht wird das organische Material bei 400°C ausgebrannt. Nach dem Aufbringen aller Elektroden legt man die Quarze über Nacht in N-Methylpyrrolidon, um eventuelle Reste des organischen Materials zu entfernen. Zur Gewährleistung, dass alles organische Material entfernt ist, werden die Elektroden noch vorsichtig mit einer Diamantpaste gereinigt.

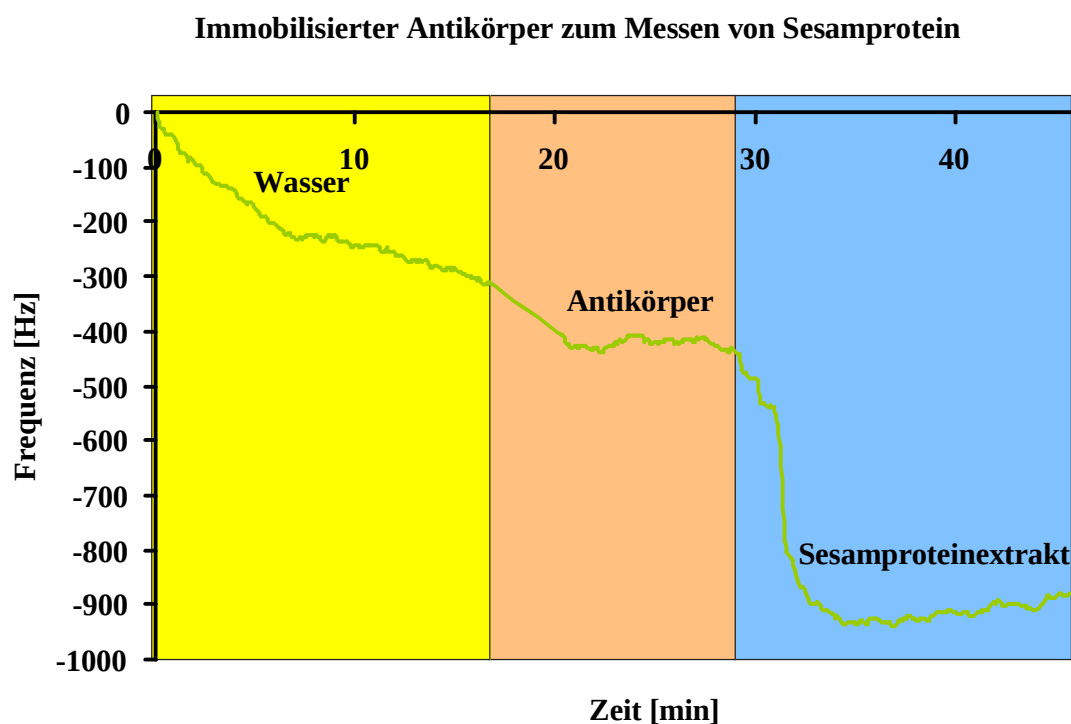


Abb. 61: QMB-Messung von Sesamproteinen auf immobilisierten (auf einer nackten Goldoberfläche) Antikörpern: zuerst wird PBS-Puffer injiziert. Wenn die Frequenz konstant ist, gibt man die Lösung des Immunglobulins (4,1 mg/ml) zu. Wenn das Signal erneut konstant ist, kann der Sesamproteinextrakt zugegeben werden. (1 mg/ml)

Dabei ist aber wichtig, dass man nur einmal sehr vorsichtig reinigt, damit nicht auch die Goldoberfläche abgewaschen wird. Auf diesen Elektroden immobilisiert man schließlich die Antikörper, indem man den Quarz in die Messzelle einspannt und nach Konstantwerden der Frequenz mit PBS-Puffer eine Lösung des für Sesamproteine spezifischen Antikörpers injiziert. Dieser soll über die Schwefelatome im Protein an die Goldoberfläche adsorbieren. Wenn das Frequenzsignal konstant ist, gibt man das Antigen, einen Extrakt von Sesamprotein, zu, den man durch Extraktion erhält. Dazu werden 10 mg Sesam homogenisiert und mit 50 ml PBS mittels Soxhletextraktor extrahiert. Die Bindung des Proteins an den Antikörper führt zu einer Abnahme der Frequenz. Es wird nun getestet, ob die Bindung des Antigens reversibel ist. Dies ist, für die Verwendung als Immunosensor wichtig, da dann verschiedene Konzentrationen des Sesamproteins mit dem gleichen Quarz gemessen werden können. Dazu wurde 5-mal mit PBS gewaschen. Dies führte nicht zu einer Zunahme der Frequenz, der Effekt war also nicht reversibel. Auch Zugabe von Acetonitril führte zu keiner Ablösung des Proteins, obwohl es verwendet wird, um Proteine zu entfalten und somit Bindungen zu lösen. Es wurde dann versucht, den Antigen-Antikörperkomplex mit einer sauren Lösung zu spalten. Die Bindung zwischen Immunglobulin und dem dazugehörigen Antigen ist bei $\text{pH} = 7$ am stabilsten. Je geringer der pH-Wert umso leichter ist der Komplex zu brechen. Grundsätzlich ist er aber empfindlicher gegenüber Säure als gegenüber Laugen.⁵³ Beim Aufbrechen des Antigen-Antikörper-Komplexes ist es wichtig, bei einem ausreichend niedrigen pH-Wert zu arbeiten, um die Denaturierung des Antikörpers zu verhindern und ihn nicht auch abzuwaschen. In den ersten Versuchen wurde verdünnte HCl ($\text{pH} = 5$) verwendet.

Versuche um das Antigen abzuwaschen

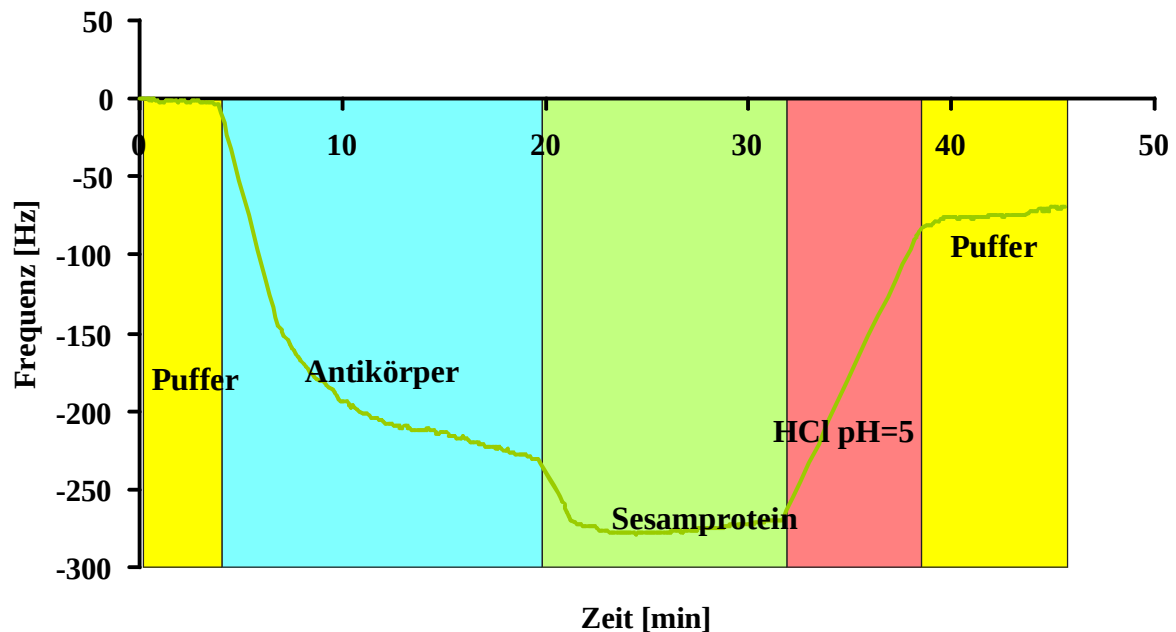


Abb. 62: Versuch die Sesamproteine mit Säure abzuwaschen: Man immobilisiert Sesamantikörper auf der nackten Goldelektrode und fügt Sesamprotein hinzu. Die Schwierigkeit liegt darin, die Bindung zu brechen und damit das Protein zu entfernen. Das Sesamprotein konnte entfernt werden, aber auch ein Großteil des Antikörpers wurde im sauren Milieu abgewaschen.

Dabei stellte sich heraus, dass beim Waschen mit Salzsäure von einem pH = 5, nach mehrmaligem Spülen, nicht nur das Sesamprotein, sondern auch ein Großteil des Antikörpers abgewaschen wird. In der Folge wurden die Waschdauer verkürzt und verdünntere Säure verwendet (pH = 5-7).

Versuche die Bindung zwischen Antikörper und Antigen zu brechen

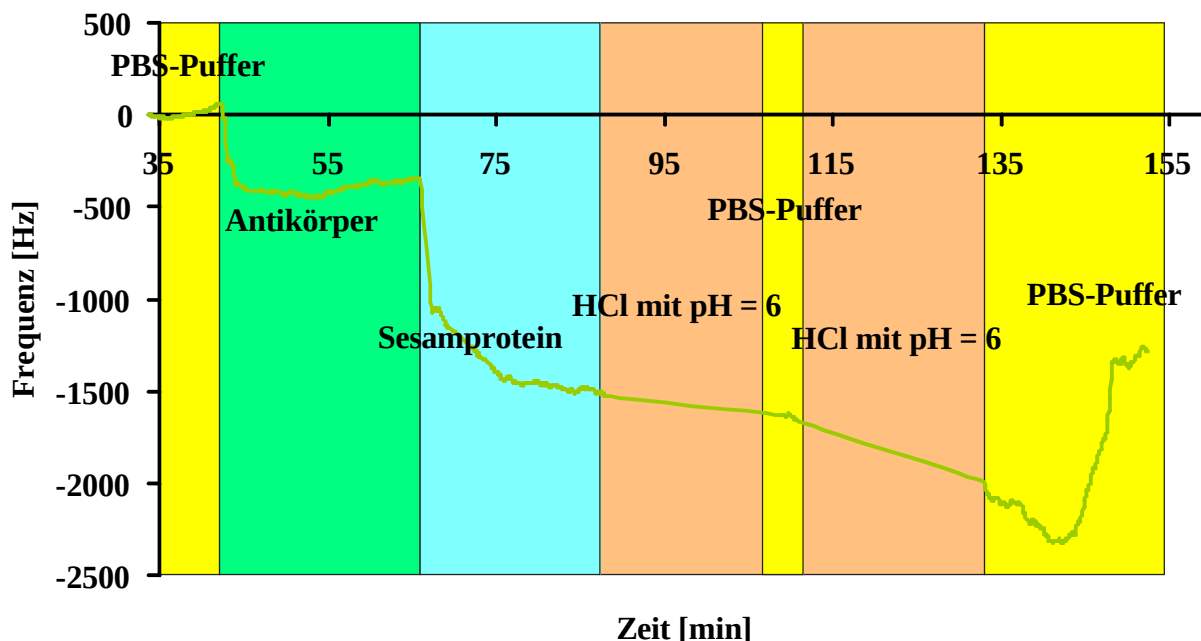


Abb. 63: Abwaschen des Antigens: Es wird Antikörper (1:7 verdünnt) auf einer Goldoberfläche immobilisiert und Sesamprotein (1:1 verdünnt) daran gebunden. Dann injiziert man verdünnte Salzsäure ($\text{pH} = 6$). Während der Injektion der Säure wurde die Messung angehalten. Dann injiziert man wieder PBS, um zu überprüfen, ob der Waschschrift erfolgreich war.

Waschen mit Säure mit $\text{pH} = 6$ führt zu einer Ablösung des Antikörpers, benötigt aber viele längere Waschschrte. Zudem ist die Reaktion schwer zu steuern. Beim Waschen mit Säure geht oft der Antikörper mit ab und die Säure zerstört die native Konformation des Antikörpers. Alternativ wurde für die Ablösung der Proteine 2 M-Guanidiniumhydrochloridlösung verwendet. Wäscht man mit dieser 10 min, so sind sowohl Antikörper als auch Sesamprotein vollständig entfernt. Die Länge des Waschschrtes wurde optimiert: 45 Sekunden für hohe Konzentrationen von Sesamprotein, 30 Sekunden für niedrige Konzentrationen. Dabei wird das Protein entfernt, nicht aber der Antikörper. Es können also das Protein entfernt und verschiedene Konzentrationen gemessen werden.

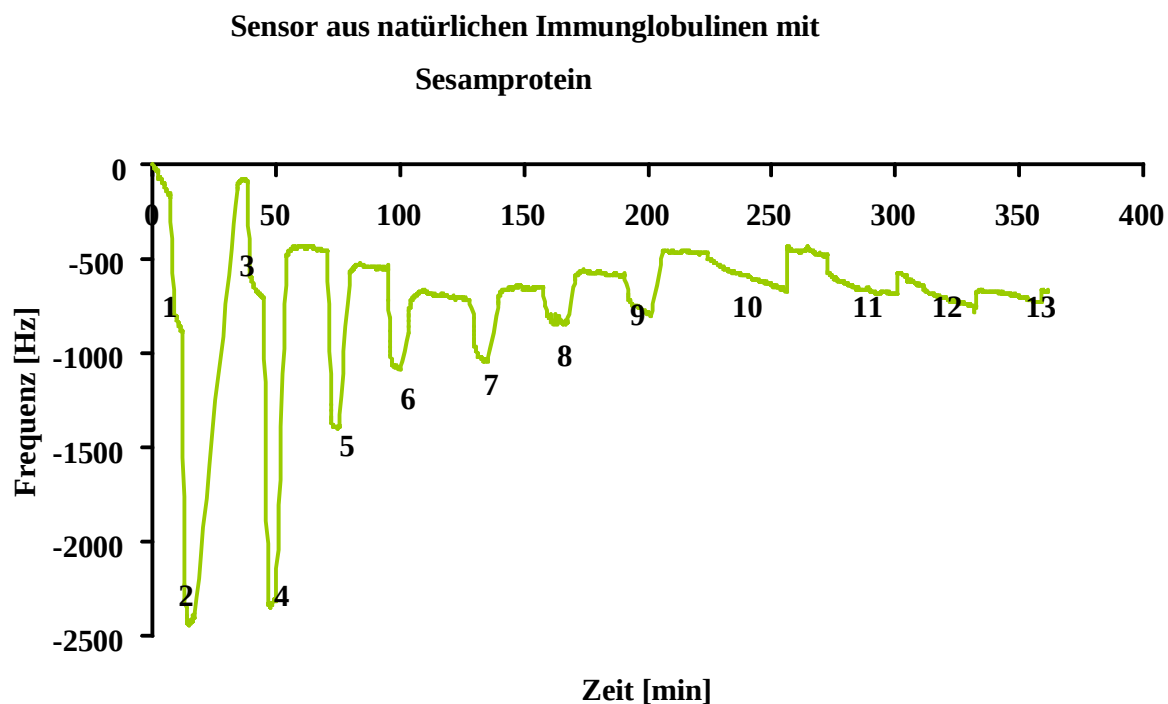


Abb. 64: Messen von verschiedenen Konzentrationen von Sesam mit natürlichen, immobilisierten Immunglobulinen. 1.) Immobilisieren des Antikörpers aus Hühnereiern 2.) 3,5 mg/ml Sesamprotein (wird abgewaschen mit Guanidiniumhydrochlorid 2M für 10 min die Frequenz steigt Antikörper und Antigen wurden beide abgewaschen) 3.) erneute Immobilisierung von Antikörper 4.) 3,5 mg/ml Sesamprotein (abgewaschen mit Guanidiniumhydrochlorid 2M) 5.) 1,75 mg/ml Sesamprotein 6.) 0,875 mg/ml Sesamprotein 7.) 0,438 mg/ml Sesamprotein 8.) 0,219 mg/ml Sesamprotein 9.) 0,110 mg/ml Sesamprotein 10.) 0,055 mg/ml Sesamprotein 11.) 0,027 mg/ml Sesamprotein 12.) 0,014 mg/ml Sesamprotein 13.) 0,007 mg/ml Sesamprotein

Aus den Messeffekten bei verschiedenen Konzentrationen wurde eine Kennlinie erstellt.

Konzentration [mg/ml]	Messeffekt [Hz]
3,500	1625
1,750	928
0,875	537
0,438	331
0,219	189
0,110	176
0,055	150
0,027	100
0,014	60
0,007	20

Tabelle 6: Konzentrationsabhängigkeit des Messeffektes mit Sesamproteinen auf natürlichen Antikörpern, immobilisiert auf einer Goldoberfläche

Abhängigkeit des Sensoreffektes mit Sesamprotein von der Konzentration

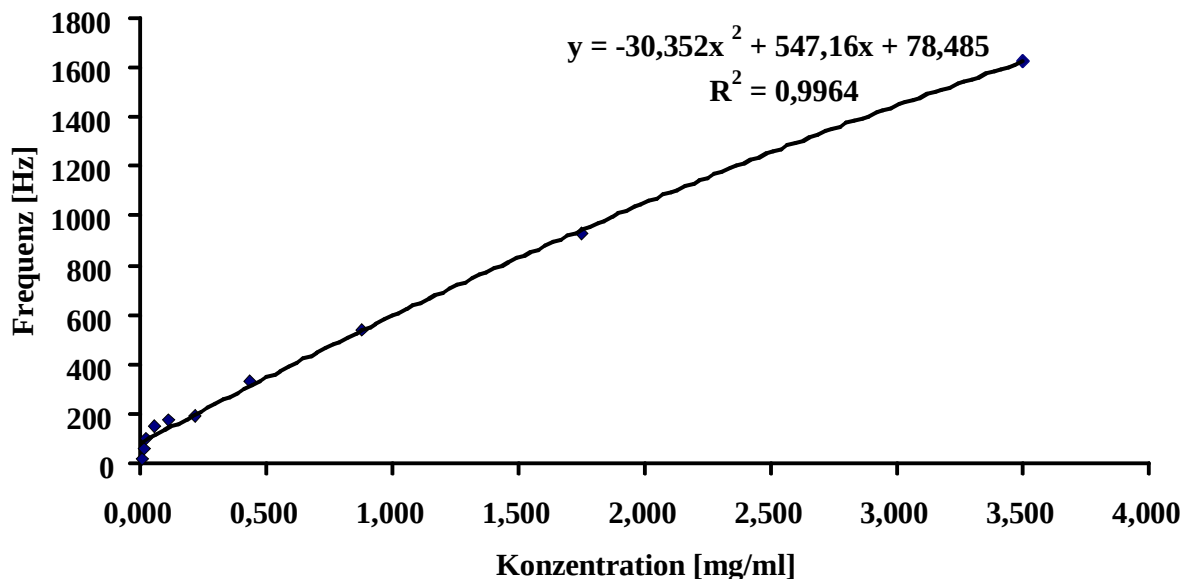


Abb. 65: Abhängigkeit des Sensoreffektes der natürlichen Immunglobuline auf einer nackten Goldoberfläche mit Sesamprotein. Für die Erstellung der Kennlinie wurde die in Abb. 64 gezeigte Kurve verwendet. Dabei zieht man jeweils den Leerwert vor Zugabe des Sesamproteins (also die Frequenz, bei der nur der Antikörper auf der Elektrode ist) ab.

Man erhält eine Sensorkennlinie, die zu Beginn steil ansteigt und dann abflacht. Die Anfangssteigung beruht auf der Bildung einer Monolage auf der Goldoberfläche. Der Effekt von 130 Hz entspricht einer Anlagerung von 5,2 nm. Aus der Masse des Proteins (250000 Da) und einer Dichte von ca. 1 g/cm³ lässt sich die Dicke einer Monolage berechnen, diese ist für quadratische Moleküle 7 nm. Die reale Gestalt der Moleküle ist aber nicht quadratisch, weshalb man aufgrund von Zwischenräumen eine etwas kleinere Massenanlagerung für eine Monolage erwartet. Das entspricht den gemessenen 130 Hz. Der weitere Anstieg der Kurve in Abb. 65 kommt durch den Aufbau einer Multilage zustande (ähnlich dem BET-Modell). Die Empfindlichkeitsgrenze liegt dabei im einstelligen ppm-Bereich und ist damit vergleichbar mit kommerziell erhältlichen Systemen [41]. Um die Spezifität des Sensors zu überprüfen, kann man die Denaturierung des Proteins verfolgen. Dazu injiziert man verschieden stark erhitzte Proben und vergleicht deren Messeffekt. Dabei sollte die Frequenz mit dem Denaturierungsgrad abnehmen.

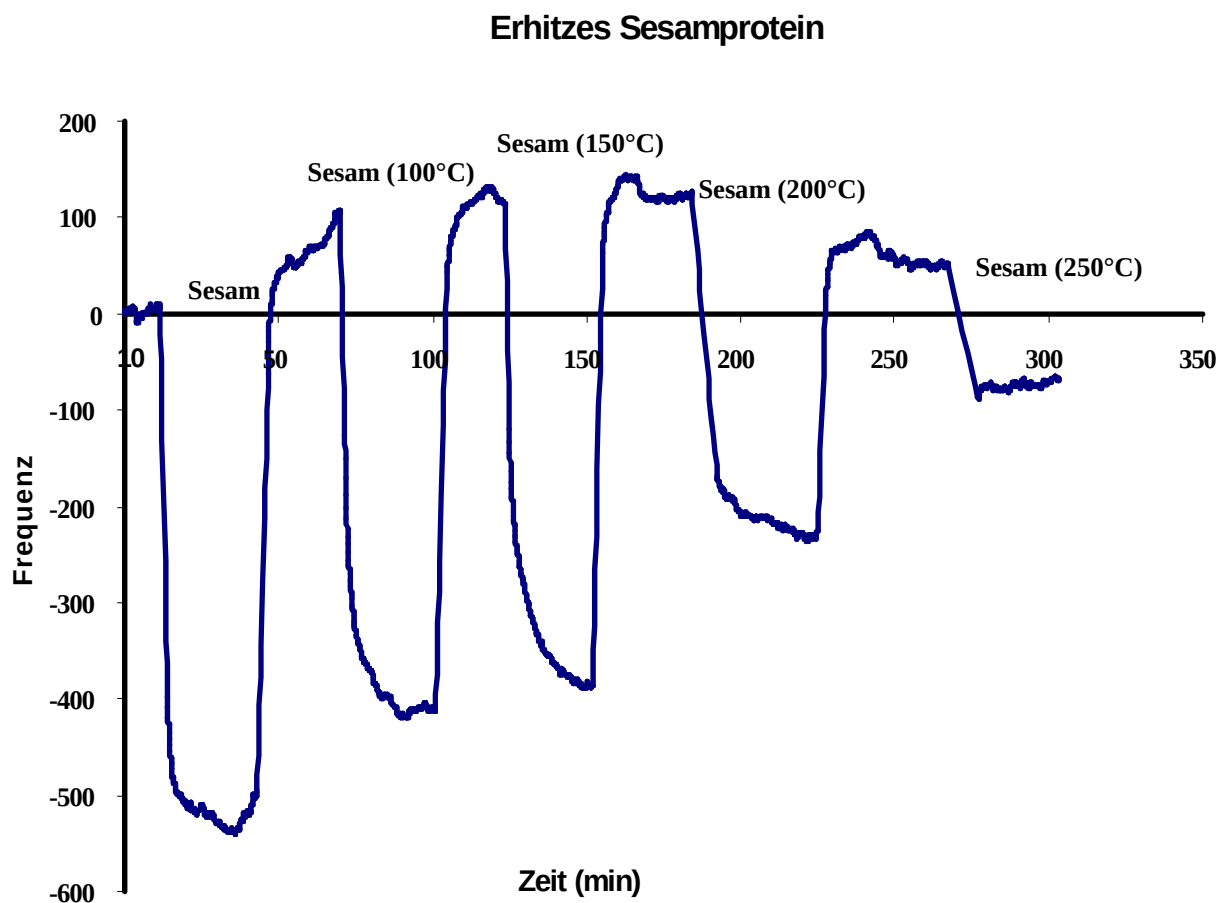


Abb. 66: Messung von denaturiertem Sesamprotein (mit natürlichen Antikörpern auf einer Goldoberfläche immobilisiert): Man erhitzt die Proben unterschiedlich stark und misst die Frequenzänderung des Sensors bei gleichen Konzentrationen (0,88 mg/ml). Wie erwartet ergeben die Proben die stärker erhitzt wurden weniger Signal.

Wie erwartet sinkt der Messeffekt mit der Temperatur, auf die die Proben erhitzt worden sind.

Um sicher zu gehen, dass die Bindung des Antigens spezifisch ist, und um später mit den künstlichen Antikörpern vergleichen zu können, wurde auch die Querselektivität zu anderen Proteinen gemessen. Dazu injiziert man Paranuss-Proteine in der gleichen Konzentration wie die Sesamproteine. Der Extrakt der Paranüsse hatte eine Proteinkonzentration von 48,0 mg/ml (photometrisch bestimmt mit der Methode nach Bradford).

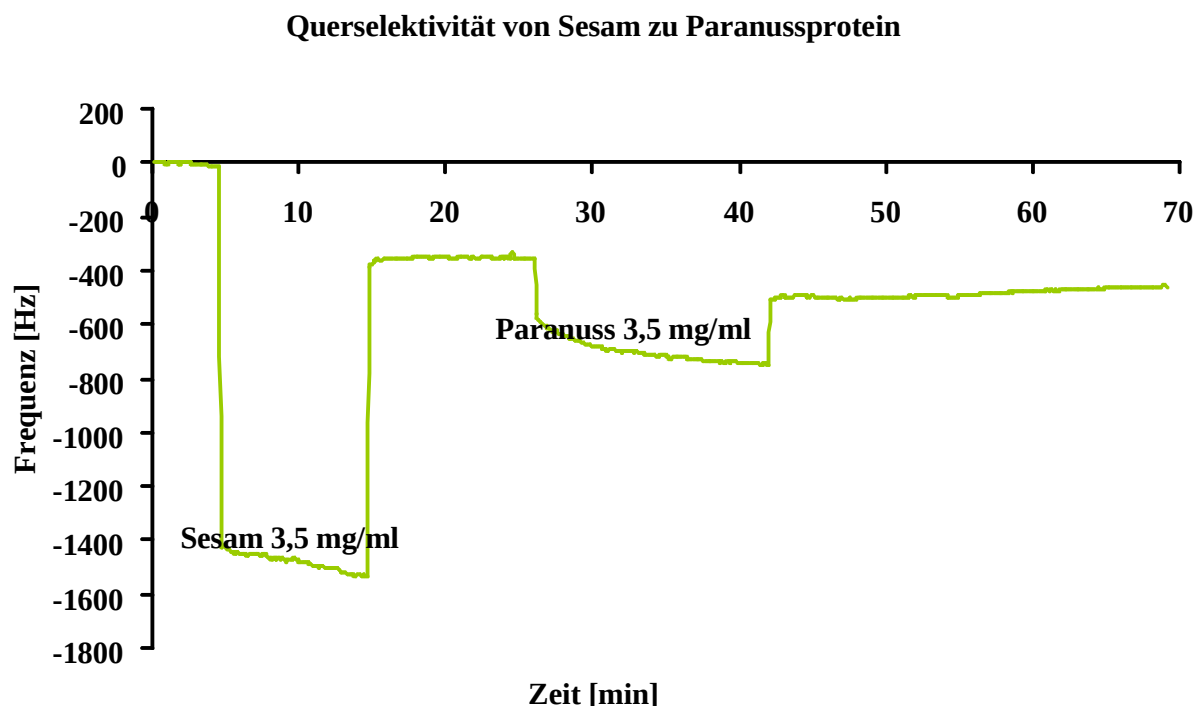


Abb. 67: Querselektivität von Sesamprotein und Paranussprotein, gemessen mit immobilisierten Immunglobulinen auf einer Goldoberfläche

Aus der Messkurve ist ersichtlich, dass der Antikörper selektiv an das Antigen (1530 Hz) bindet. Der Messeffekt mit den Paranussproteinen (200 Hz) ist viel geringer.

Unvollständige Reversibilität, die bei der ersten gemessenen Konzentration auftritt, danach aber nicht mehr, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass an manchen Stellen auf der Elektrode die Bindung des Analyts so günstig ist, dass die Bindung durch die folgenden Waschschrte nicht mehr gebrochen wird.

Um die Querempfindlichkeit zu verbessern und um später in komplexen Matrices, in diesem Fall Lebensmitteln, messen zu können, testet man verschiedene Waschschrte. Da in diesem Fall ohne Referenz gearbeitet wird, sind bei den Messungen hohe Ionenstärken oder hohe Viskosität besonders störend. Die Strategie ist, die Lebensmittelprobe in die Messzelle zu injizieren, das Sesamprotein binden zu lassen, die Matrix abzuwaschen und erst dann die Frequenzänderung zu messen. Das hat den Vorteil, dass man nicht direkt in der Probelösung messen muss. Dazu wurde überprüft, ob es möglich ist, einen Waschschrte nach Injektion des Analyten durchzuführen.

Versuche nach dem Injizieren des Analytes zu waschen

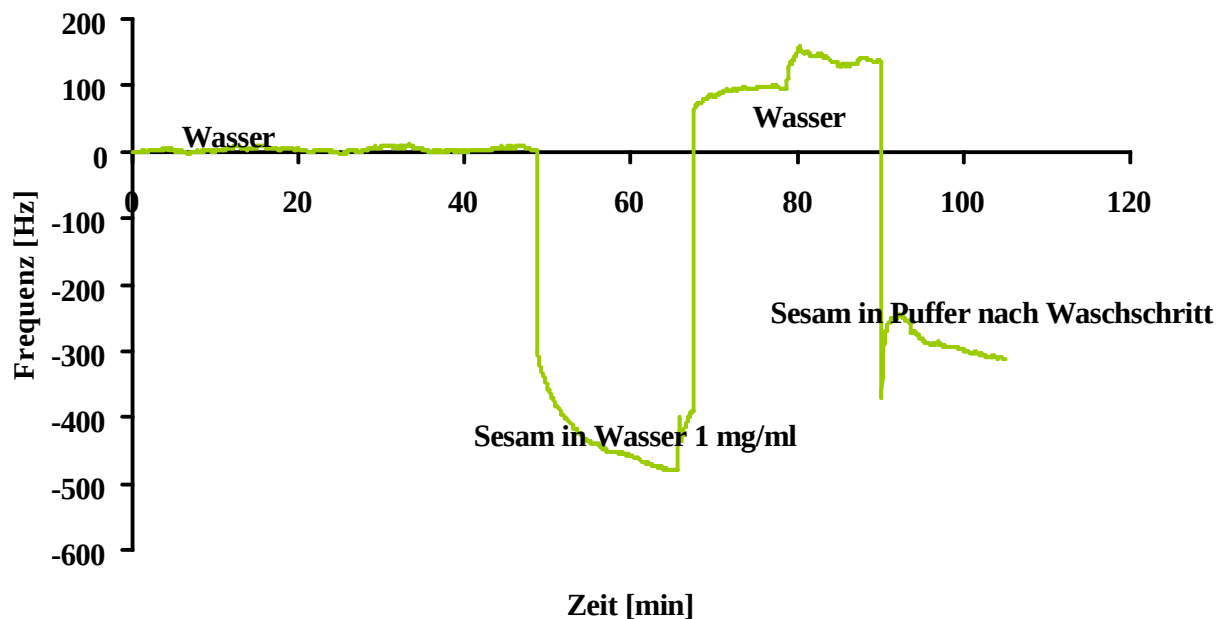


Abb. 68: QMB Messung mit immobilisierten Antikörpern auf einer Goldoberfläche, um zu testen, ob ein Waschschrift nach Injektion des Analyten möglich ist: dazu wurde Wasser und dann 1 mg/ml Sesamprotein injiziert, gewartet bis die Frequenz konstant ist, wie oben mit 2M Guanidiniumhydrochlorid gewaschen (dabei wird die Messung angehalten) und wieder Wasser zugegeben. Wenn die Frequenz konstant ist, wird die Messung angehalten, Sesam in Extraktionspuffer zugegeben, 5 Minuten gewartet und das Lösungsmittel in Wasser getauscht. Dann setzt man die Messung fort.

Aus Abb. 68 ist ersichtlich, dass es möglich ist das Lösungsmittel zu tauschen, ohne das Antigen wieder abzuwaschen, da die Bindung stark genug ist, dass der Sesam beim Waschen gebunden bleibt. Dies ist besonders wichtig für Messungen in störenden Matrices, da diese dann bei der Messung entfernt werden können.

Schließlich wurden auch andere Proteine gemessen, die eine Querempfindlichkeit zeigen könnten. Dabei wurden Proben ausgewählt, die in einer Realprobe (zum Beispiel Brot) vorkommen, und daher in der Praxis die Messung in der Matrix stören könnten.

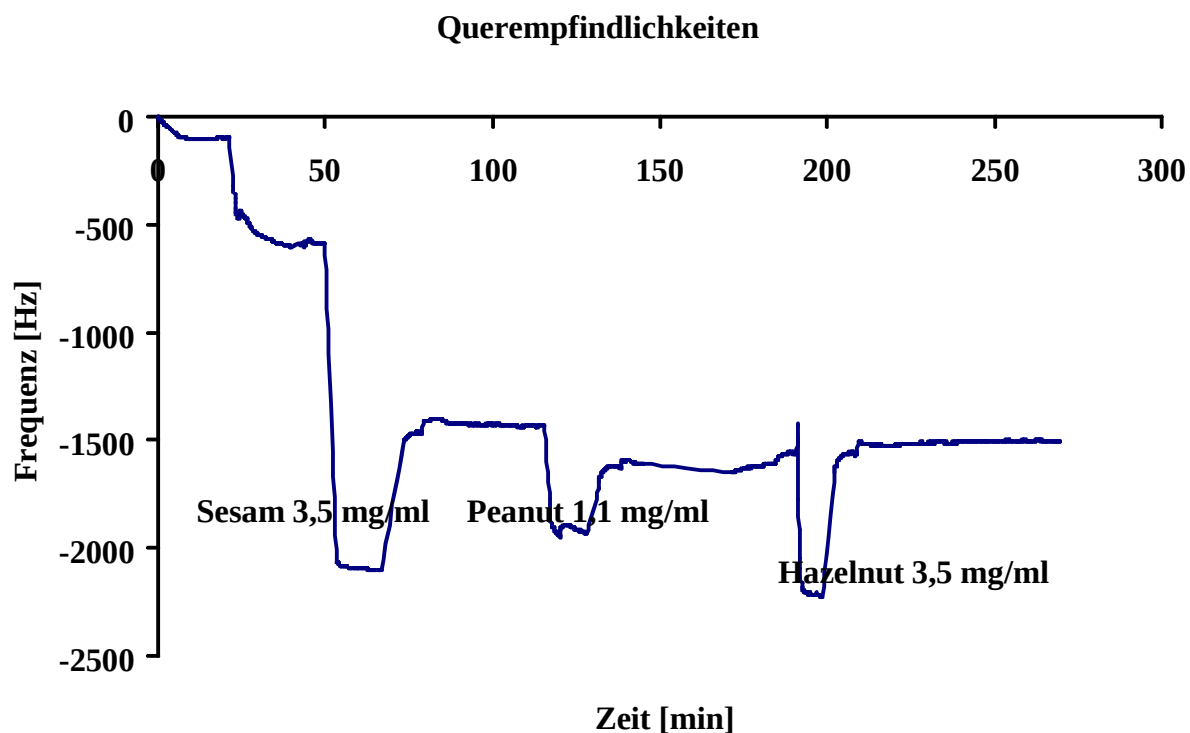


Abb. 69: QMB-Messung von Sesamproteinen und anderen Proteinen auf immobilisierten Antikörpern

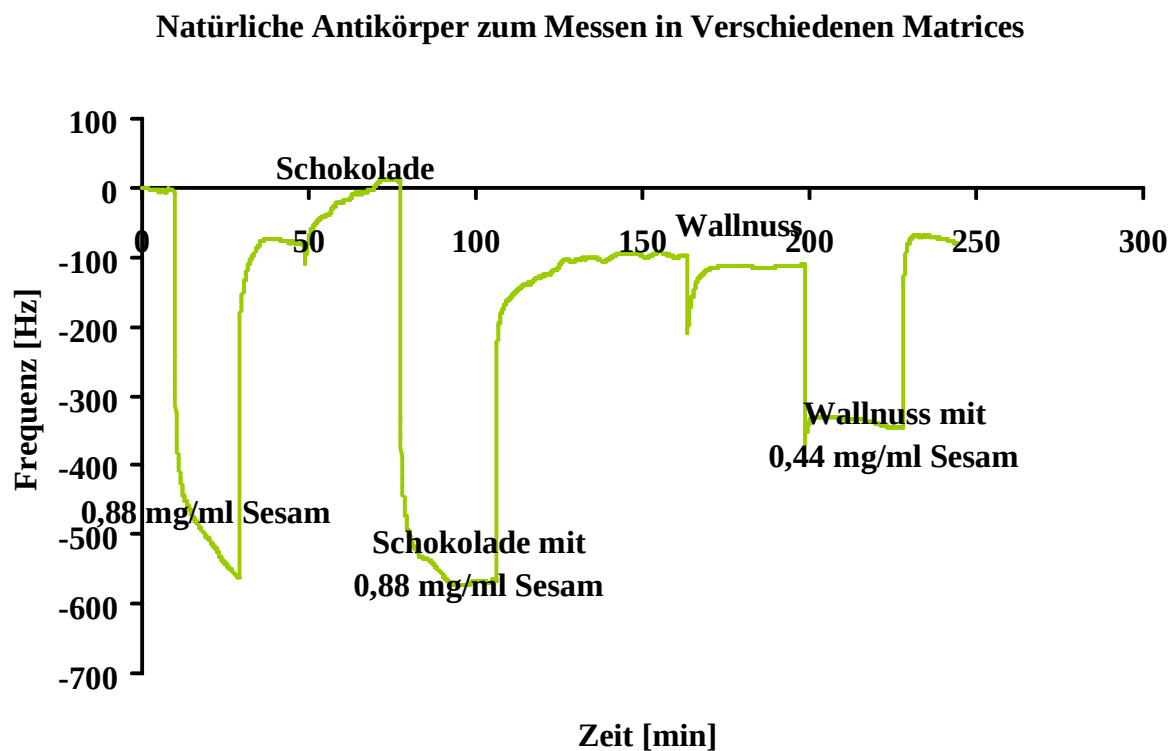


Abb. 70: QMB-Messung von Sesamprotein in verschiedenen Matrices mit natürlichen Immunglobulinen, immobilisiert auf einer Goldoberfläche

Sesam in Lebensmittelproben

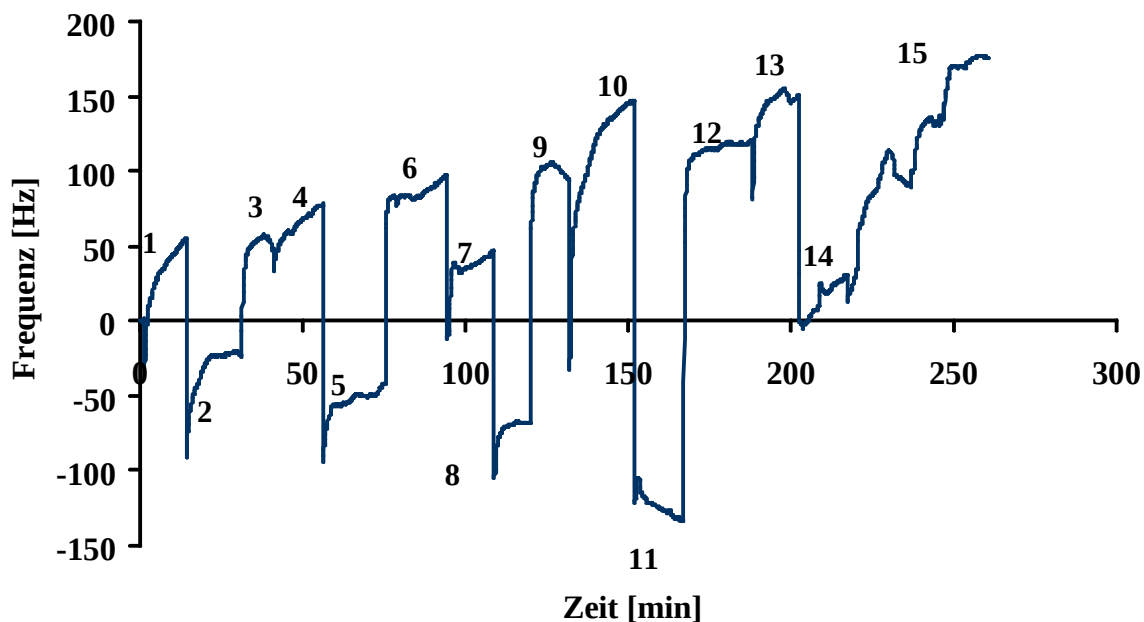


Abb. 71: Künstliche Antikörper (aus Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden) zum Messen von Sesam in verschiedenen Lebensmitteln: 1) Wasser 2) Sesam (0,027 mg/ml) 3) Wasser 4) Getreideextrakt 5) Getreideextrakt mit Sesam 6) Wasser 7) Mandelextrakt 8) Mandelextrakt mit Sesam 9) Wasser 10) Sonnenblumensamen 11) Sonnenblumensamen mit Sesam 12) Wasser 13) Honig 14) Honig mit Sesam 15) Wasser.

Für die Messung injiziert man die Lebensmittelproben, lässt die Messzelle 5 Minuten stehen, damit die Sesamproteine einlagern können, und spült dann mit destilliertem Wasser.

Aus den Messungen in Abb. 69, Abb. 70 und Abb. 71 ist ersichtlich, dass mit Ausnahme der problematischen Erdnussprobe wenig oder keine Querempfindlichkeiten mit Bestandteilen der Proben existieren. Die Erdnussprobe ist problematisch, da Erdnüsse einige zu Sesamproteinen analoge Proteine besitzen. Schließlich sollten noch Realproben gemessen werden. Dazu wurde der Extrakt eines Vollkornbrotes (Ströck) verwendet.

Messen von verschiedenen Konzentrationen von Sesam in Vollkornbrotextrakt

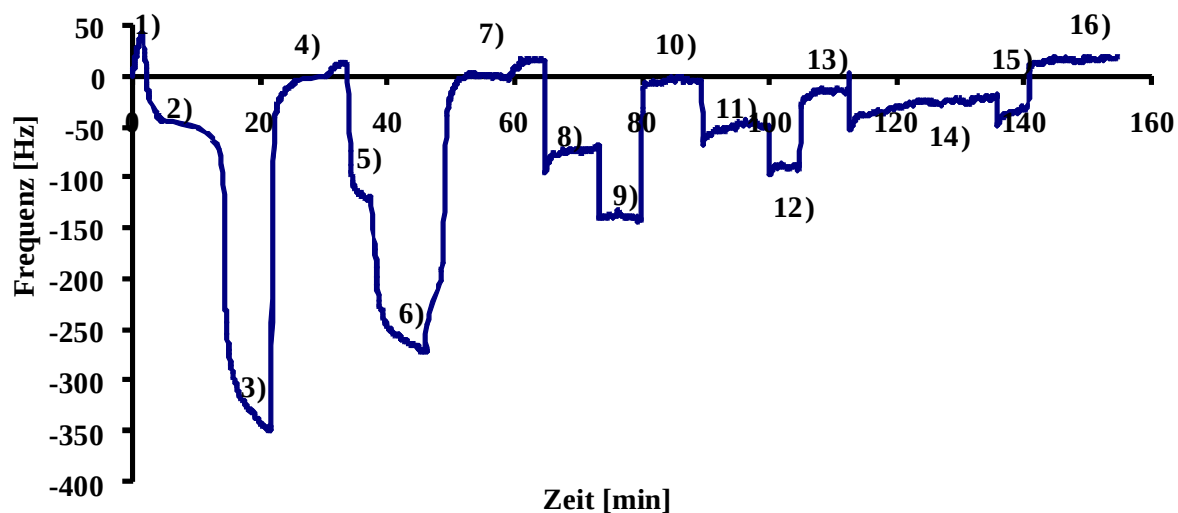


Abb. 72: QMB-Messung von verschiedenen Konzentrationen von Sesamprotein in Vollkornbrotmatrix mit natürlichen Antikörpern: 1) Wasser 2) Vollkornbrot 3) Vollkornbrot + Sesam 0,438 mg/ml 4) Wasser 5) Vollkornbrot 6) Vollkornbrot + Sesam 0,219 mg/ml 7) Wasser 8) Vollkornbrot 9) Vollkornbrot + Sesam 0,055 mg/ml 10) Wasser 11) Vollkornbrot 12) Vollkornbrot + Sesam 0,014 mg/ml 13) Wasser 14) Vollkornbrot 15) Vollkornbrot + Sesam 0,007 mg/ml

Konzentration [mg/ml]	Messeffekt in Matrix [Hz]
0,438	300
0,219	150
0,055	70
0,014	38
0,007	15

Tabelle 7: Messeffekt des Sesamproteins bei verschiedenen Konzentrationen in Matrix

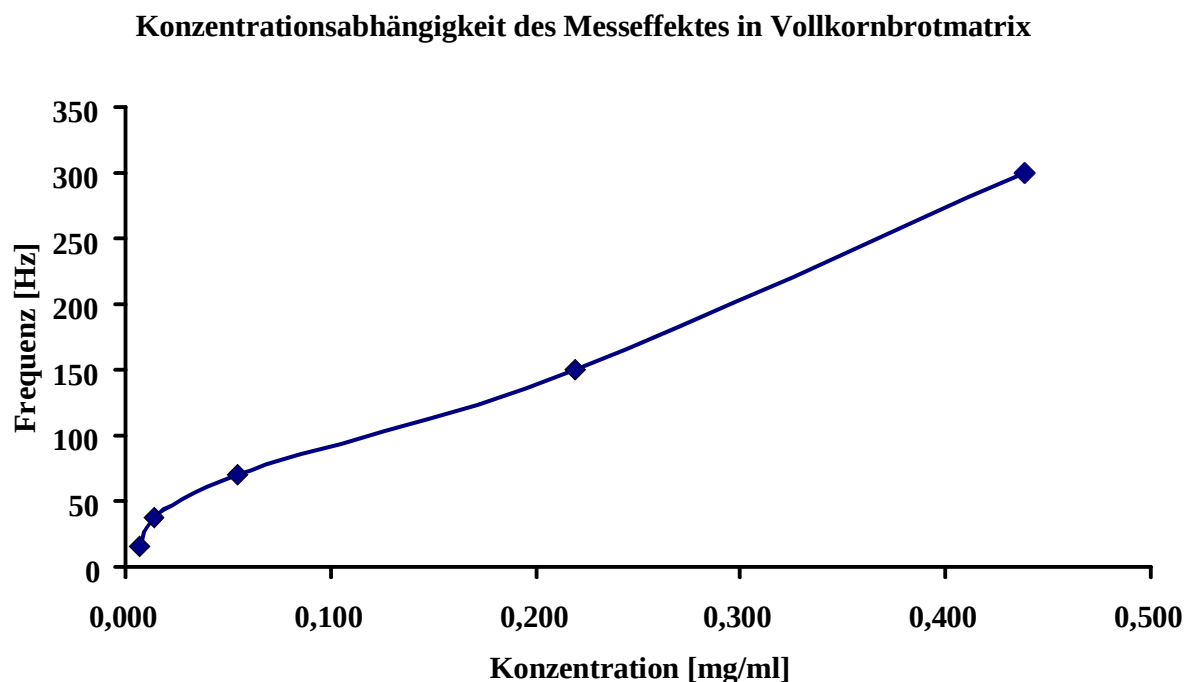


Abb. 73: Konzentrationsabhängigkeit des Messeffektes mit natürlichen Antikörpern

Aus Abb. 72 ist ersichtlich, dass der Nullwert (also Vollkornbrotextrakt) etwas unterschiedlich sein kann. Dies liegt an der Inhomogenität der Probe. Man erhält aber für die Abhängigkeit des Messeffektes von der Konzentration nach Abzug des Nullwertes (nur Vollkornbrot) innerhalb der Messungenauigkeiten die gleichen Effekte wie in Wasser. (siehe dazu Abb. 64 und Abb. 65)

Da aus der Literatur^(54,55) bekannt ist, dass Antikörper in ähnlichen Anwendungen eine begrenzte Lebensdauer haben (etwa 30 Regenerierungsschritte), testet man wie lange man den Sensor verwenden kann, ohne den Antikörper neu aufzubringen. Die Haltbarkeit des Antikörpers ist limitierend für die Lebensdauer des Sensors. Wird neuer Antikörper auf dem Sensor immobilisiert, kann mit demselben Quarz weiter gearbeitet werden (man erhält vergleichbare Ergebnisse). Es wurde durch Injektion bekannter Proben mit bestimmten Konzentrationen jeden Tag am Beginn der Messung geprüft, ob der Sensor noch funktioniert. Die Sensoren sind etwa 14 Tage haltbar. Dann muss neuer Antikörper immobilisiert werden.

Künstliche Antikörper zur Detektion von Sesamproteinen

Es sollten künstliche Antikörper nach der oben beschriebenen Vorschrift hergestellt werden, die Sesamproteine selektiv binden. Dazu stellt man Nanopartikel her, die mit den Immunglobulinen-Y aus Hühnereiern geprägt sind. Man mischt die Komponenten des Polymers (siehe Tabelle 1) und fügt für die geprägten Partikel zusätzlich 5 mg des Antikörpers hinzu (dazu musste der Antikörper, der in Lösung vorhanden ist zuerst einrotiert werden). Diese Mischung lässt man unter UV-Licht einige Minuten polymerisieren. Dieses Prepolymerisat wird unter heftigem Rühren in Acetonitril praezipitiert, wo die Partikel ausfallen. Diese Partikel werden gewaschen mit Wasser und für den Prägeprozess auf Glasplättchen aufgebracht, die später als Stempel dienen. Man lässt die Proben trocknen und drückt den Stempel in ein Polymer, das auf einen Quarz aufgebracht ist (siehe oben). Man erhält eine Schichtdicke von etwa 100 – 200 nm. Diese wird bestimmt, indem man die Resonanzfrequenz des Quarzes vor und nach Auftragung der Polymerschicht misst. Ein Frequenzunterschied von 1 kHz entspricht einer Schichtdicke von etwa 40 nm. Die Schichtdicke kann auch mittels AFM bestimmt werden. Dazu ritzt man mit einer Klinge die Polymerschicht weg und bestimmt die Kratztiefe mittels AFM.

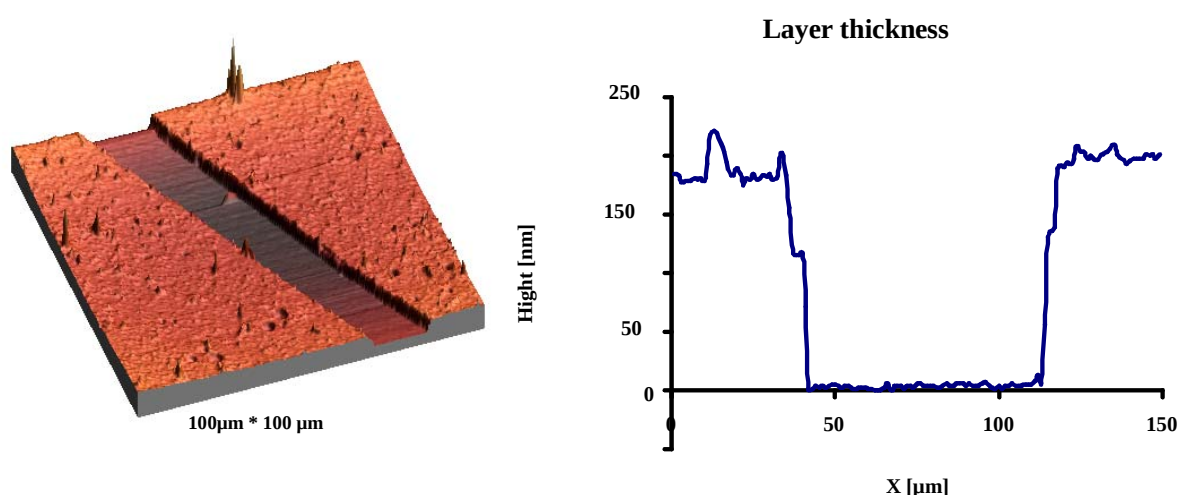


Abb. 74: AFM-Bild für die Bestimmung der Schichtdicke des Polymers (Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer) für die Messung mit künstlichen Antikörpern und Höhenprofil des Kratzers

Ein Stempel mit den ungeprägten Partikeln kommt auf die zweite Elektrode und dient als Referenz. Man lässt über Nacht aushärten und nimmt die Stempel ab. Der Erfolg der Prägung wurde mittels AFM überprüft.

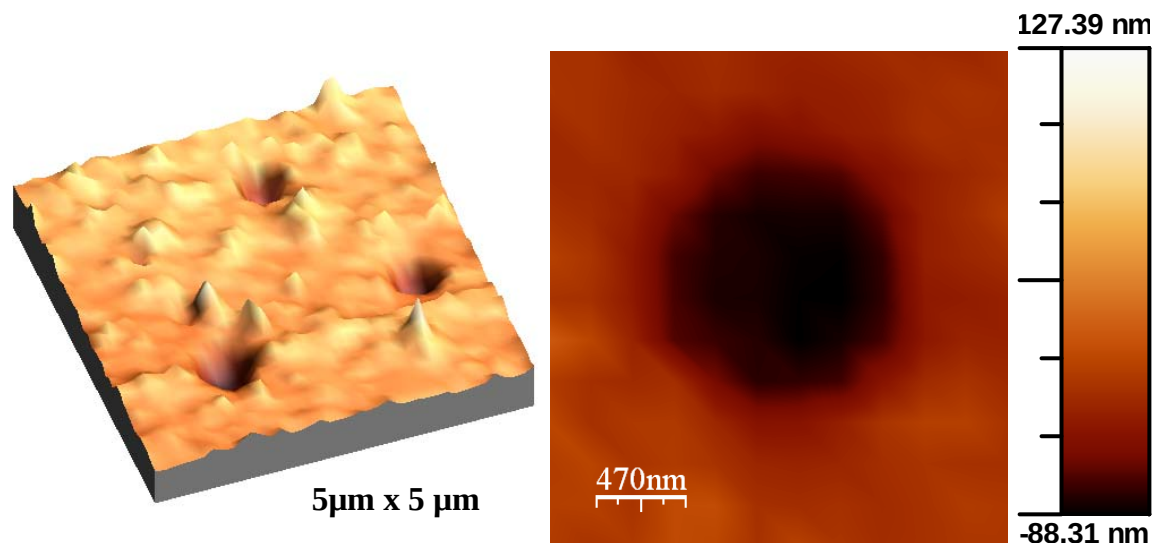


Abb. 75: AFM-Bilder um den Erfolg der Prägung mit geprägten Partikeln zu überprüfen

Die so hergestellten Quarze können zum Messen von Sesamproteinen verwendet werden. Das Prinzip der Prägung ist in Abb. 76 dargestellt.

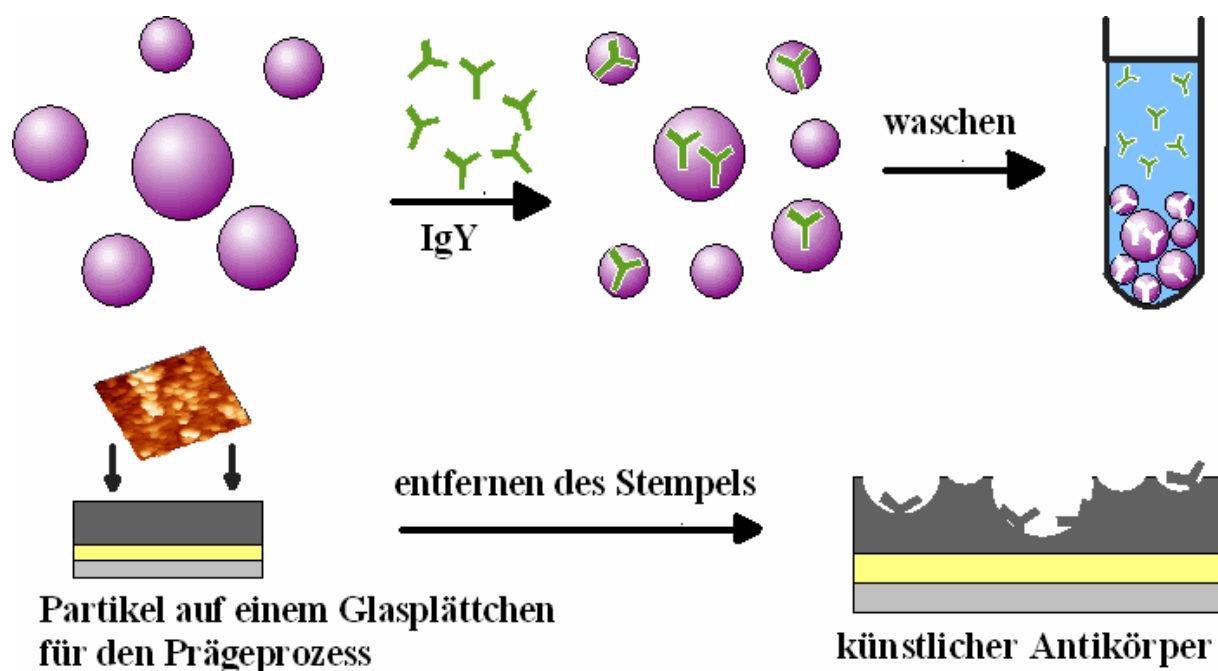


Abb. 76: Prinzip zur Herstellung künstlicher Immunglobuline

Dazu integriert man den Quarz in die Messzelle und misst die Frequenzänderung bei Einlagerung von Sesamprotein. Man injiziert abwechselnd Wasser und Sesamprotein in verschiedenen Konzentrationen und misst die Frequenzänderung.

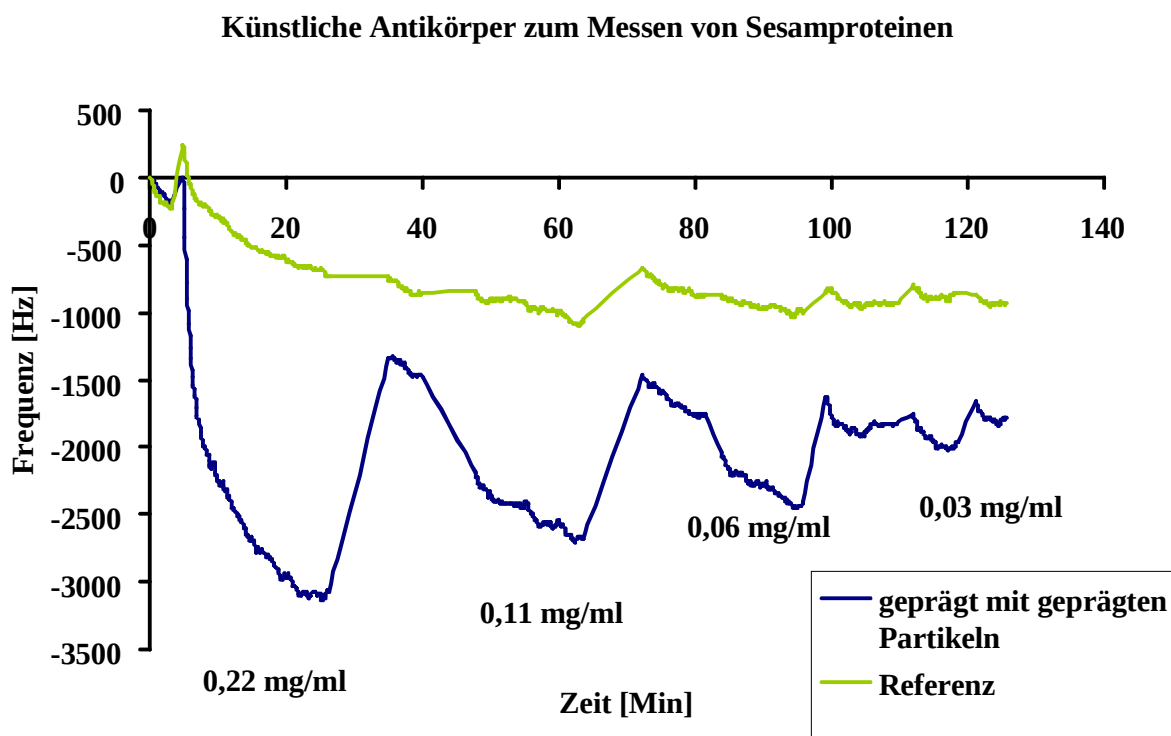


Abb. 77: QMB-Messung mit den künstlichen Antikörpern zum Messen von Sesamproteinen (aus Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden): Man injiziert abwechselnd Sesamproteinextrakt und Wasser und erhält einen Messeffekt, der von der zugegebenen Konzentration an Sesamprotein abhängig ist.

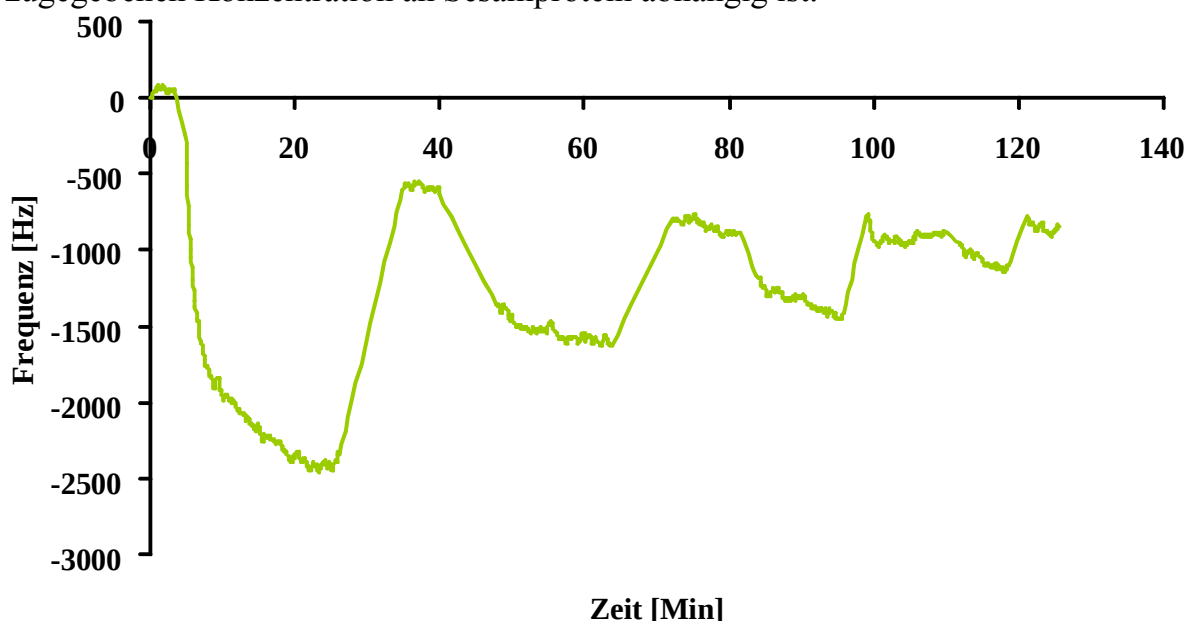


Abb. 78: Differenzkurve der in Abb. 77 gezeigten Messkurve

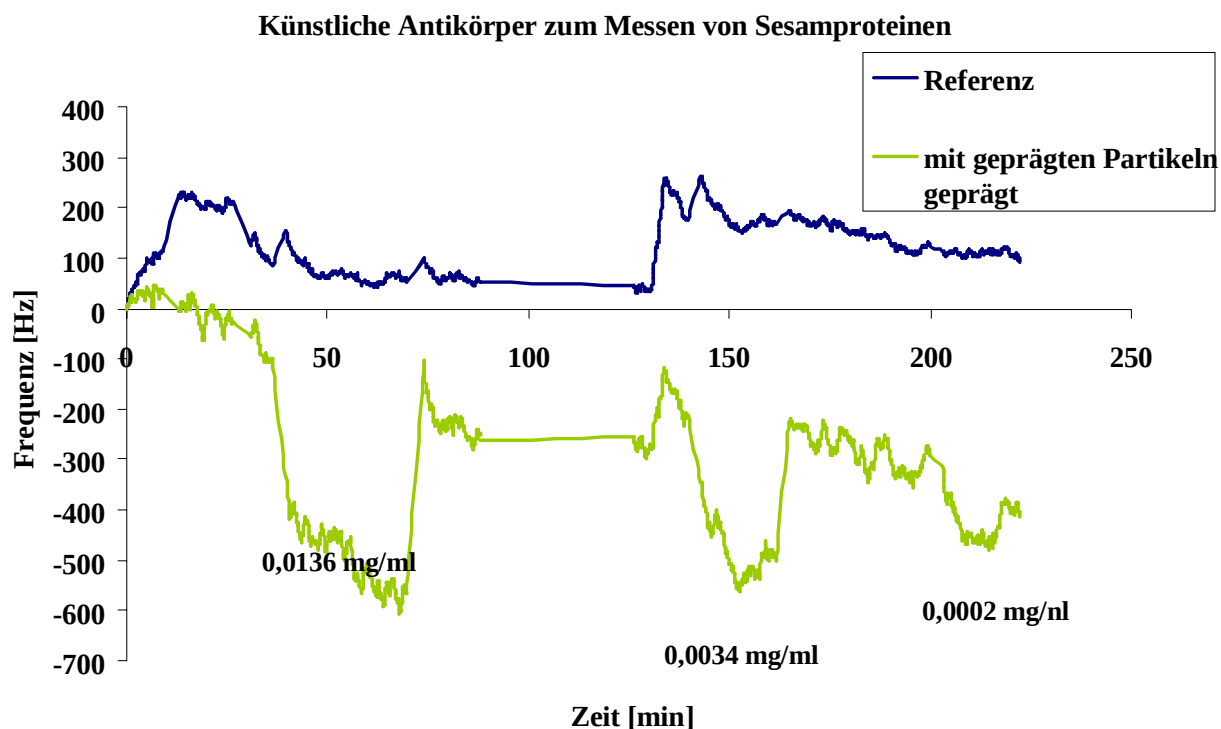


Abb. 79: kleine Konzentrationen gemessen mit künstlichen Immunglobulinen (aus Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden)

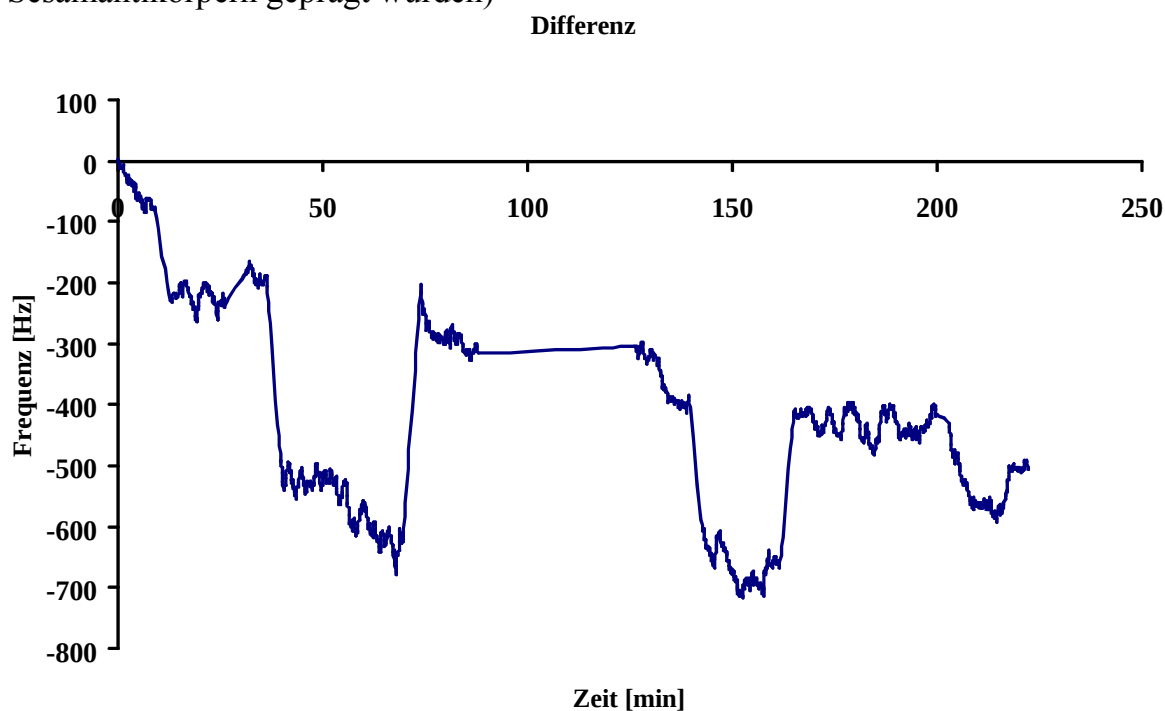


Abb. 80: Differenzkurve der in Abb. 79 dargestellten Messkurve

Man erhält einen Messeffekt, der wie erwartet von der Konzentration der injizierten Proteinlösung abhängt. Das Detektionslimit liegt bei etwa 0,0002 mg/ml, das der natürlichen Immunglobuline lag bei 0,007 mg/ml.

Konzentration [mg/ml]	Effekt Ref. [Hz]	Effekt gep. [Hz]	Effekt Diff. [Hz]
0,2190	-687	-3110	-2423
0,1095	-279	-1293	-1014
0,0548	-132	-650	-518
0,0274	48	-180	-228
0,0137	-55	-516	-461
0,0034	95	-254	-349
0,0002	-37	-176	-139

Tabelle 8: Verschiedene Konzentrationen von Sesamprotein und die gemessenen Frequenzänderungen (gemessen mit der Replika der Sesamantikörper)

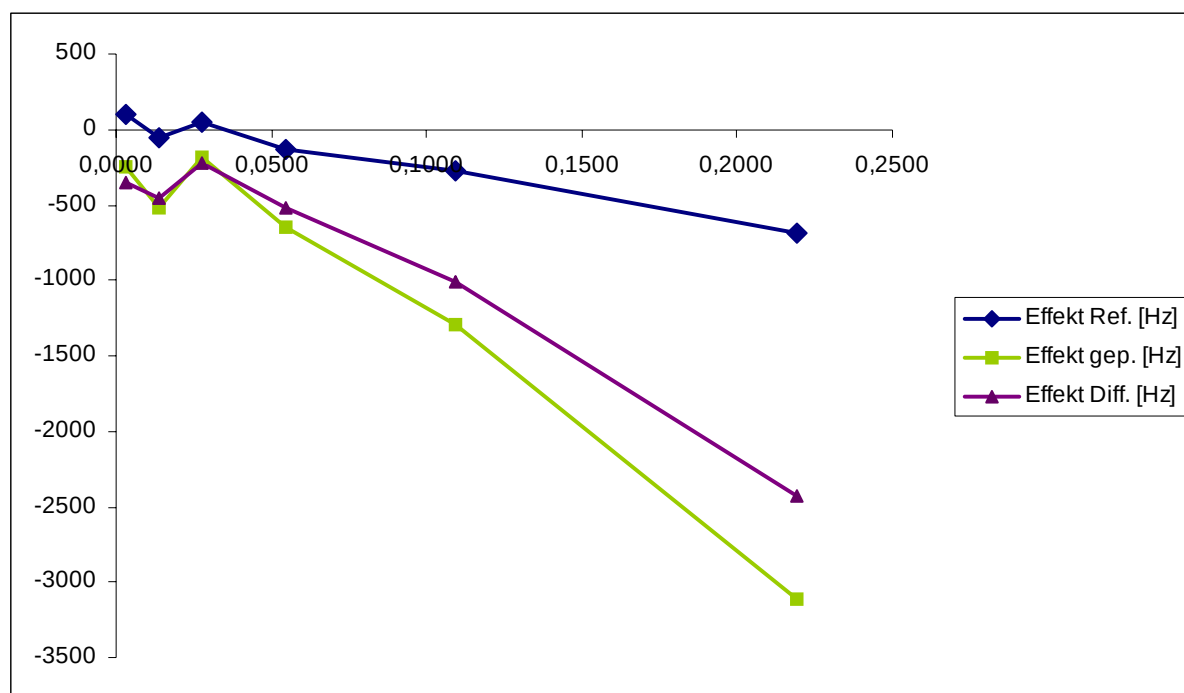


Abb. 81: Kennlinie der künstlichen Immunglobuline mit Sesamproteinen (aus Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden)

Man kann die Änderung des Messeffektes bei Einlagerung unterschiedlich stark denaturierter Proteine beobachten. Um die Denaturierung des Sesamproteins beim Erhitzen zu beobachten, wurde Sesamprotein wie mit den natürlichen Antikörpern auf verschiedene Temperaturen erhitzt und die Einlagerung in die sensitive Schicht gemessen.

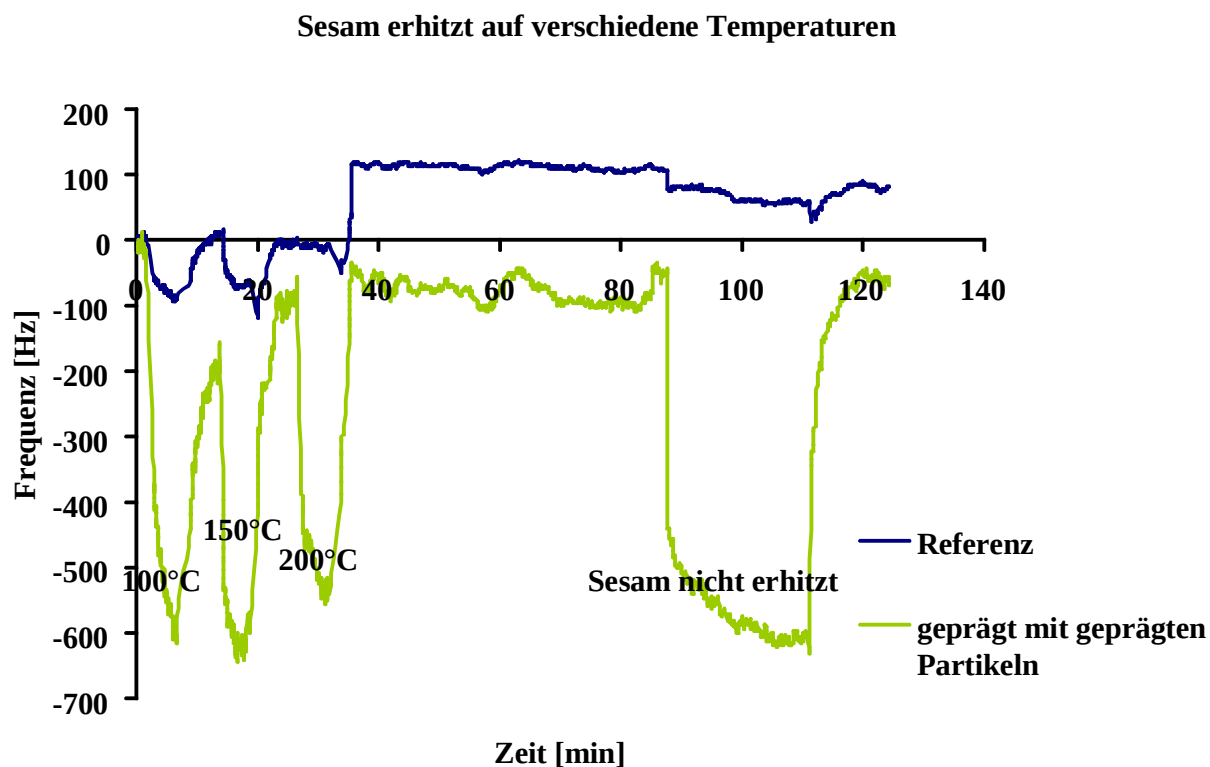


Abb. 82: Messen von Sesamproteinen (aus Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden), die auf verschiedene Temperaturen erhitzt wurden, um die Denaturierung der Proteine zu beobachten (die Proben sind für die Messung auf eine Konzentration von 0,027 mg/ml mit Wasser verdünnt worden)

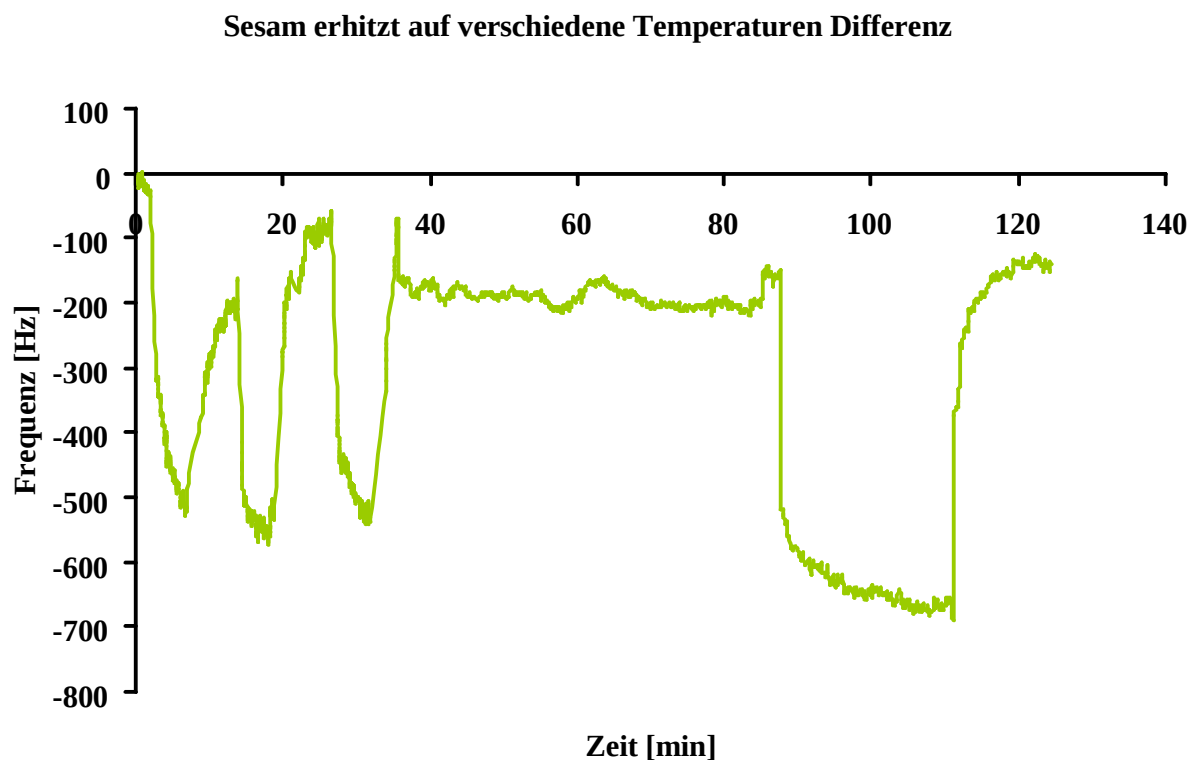


Abb. 83: Differenzmessung der in Abb. 82 gezeigten Messkurve

Aus Abb. 82 und Abb. 83 ist ersichtlich, dass die Frequenzänderung mit steigender Temperatur, auf die die Proteine erhitzt wurden, etwas abnimmt und somit mit der Denaturierung der Proteine. Die Änderungen des Messeffektes sind etwas weniger stark als bei den natürlichen Immunglobulinen. Dies deutet darauf hin, dass das Antigen etwas weniger spezifisch gebunden wird.

Messungen zur Selektivität der Schichten

Es sollte festgestellt werden, wie selektiv die verwendeten Schichten sind. Dazu misst man die Frequenzänderung bei Injektion verschiedener Proteine, um sicher zu gehen, dass der Sensor möglichst nur die Sesamproteine selektiv einlagert.

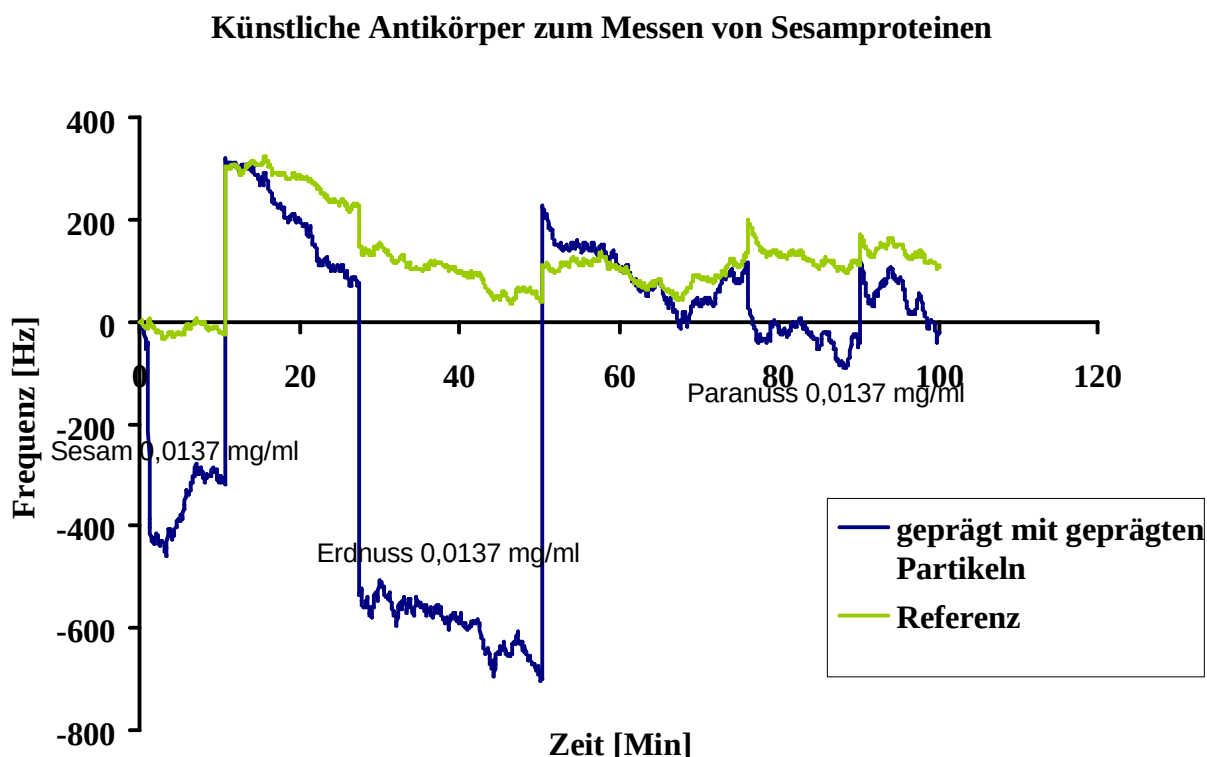


Abb. 84: QMB-Messung auf Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt sind) Querempfindlichkeit zu Paranuss und Erdnuss-Proteinen: Man injiziert abwechselnd Wasser und die Proteine. Bei Injektion der Proteine sinkt die Frequenz



Abb. 85: Differenzkurve der in Abb. 84 gezeigten Messkurve.

Wie aus den Abbildungen (Abb. 84, Abb. 85, Abb. 67) ersichtlich ist, entspricht die Spezifität der künstlichen Immunglobuline der der natürlichen.

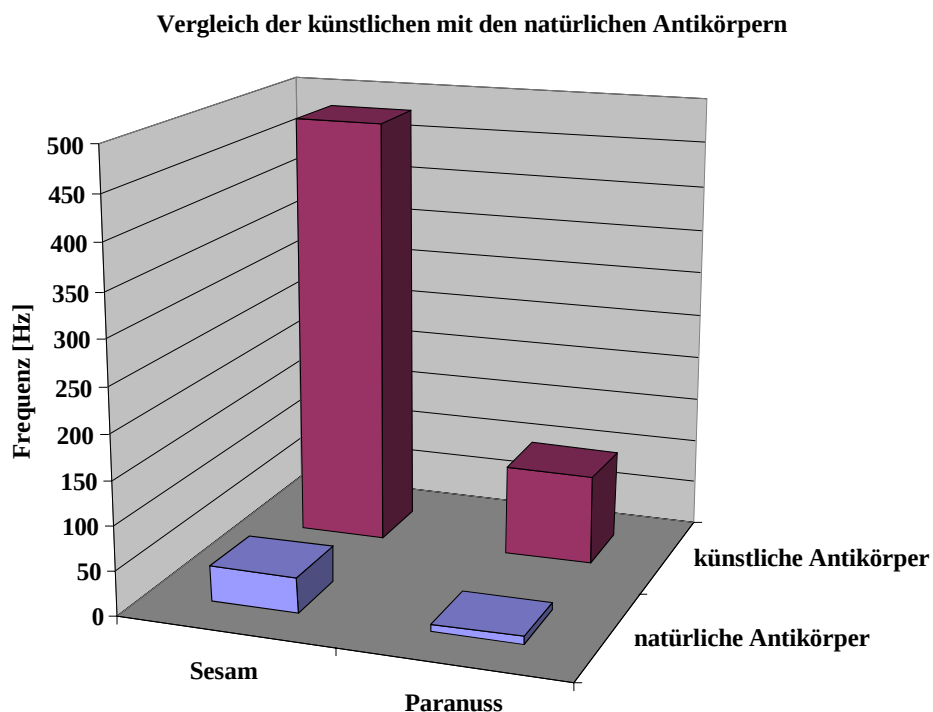


Abb. 86: Vergleich der künstlichen mit den natürlichen Antikörpern (alle Konzentrationen 0,0137 mg/ml)

Schließlich sollten die künstlichen Antikörper dazu verwendet werden, in realen Lebensmittelproben Messungen durchzuführen. Relevante Proben sind zum Beispiel Vollkornbrot oder Kekse. Als Vorbereitung für die Messung in realen Proben misst man mögliche Querempfindlichkeiten mit anderen Bestandteilen der Proben und Sesamproteine in diesen Bestandteilen (als vereinfachte Matrix). Für Messungen in besonders komplizierten Matrices ist es nötig, die Messlösungen zu verdünnen (abhängig von der Probe; die jeweilige Verdünnung wurde empirisch ermittelt). Besonders hohe Viskositäten, hohe Ionenkonzentrationen, unvollständig entfernte Fett- oder Ölrreste oder ungelöste Feststoffe (um diese zu minimieren, kann man vor der Messung auch abzentrifugieren), die auf die Elektroden sedimentieren, können die Messung erheblich stören.

Es wurde versucht in Roggenextrakt zu messen. Der Extrakt hatte eine Proteinkonzentration von 17,0 mg/ml (photometrisch bestimmt mit der Methode nach Bradford).

Messung von Sesamprotein in Roggen

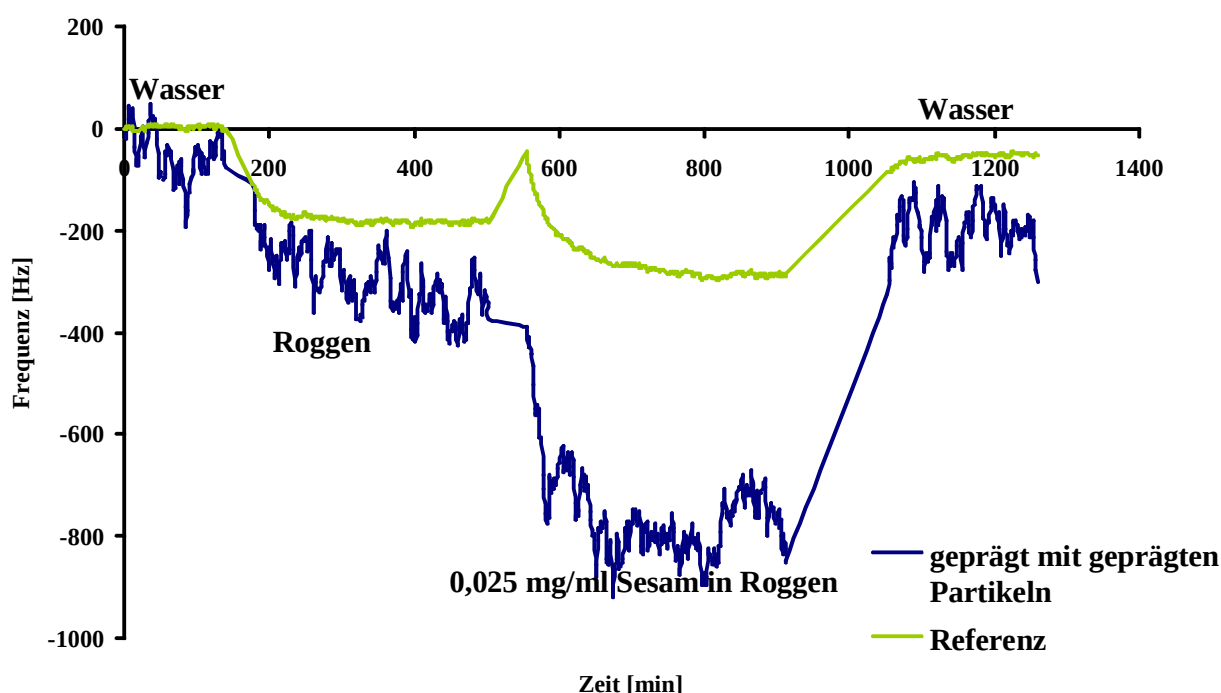


Abb. 87: Messen von Sesamprotein in einer Probe von Roggen mit künstlichen Antikörpern (Schicht geprägt mit geprägten Partikeln). Zuerst injiziert man Wasser, wartet bis die Frequenz konstant ist und gibt die Probe (der Roggenextrakt ist 1:256 verdünnt) als Nullwert zu. Dann injiziert man eine Probe mit gleicher Matrix, die aber Sesam enthält.

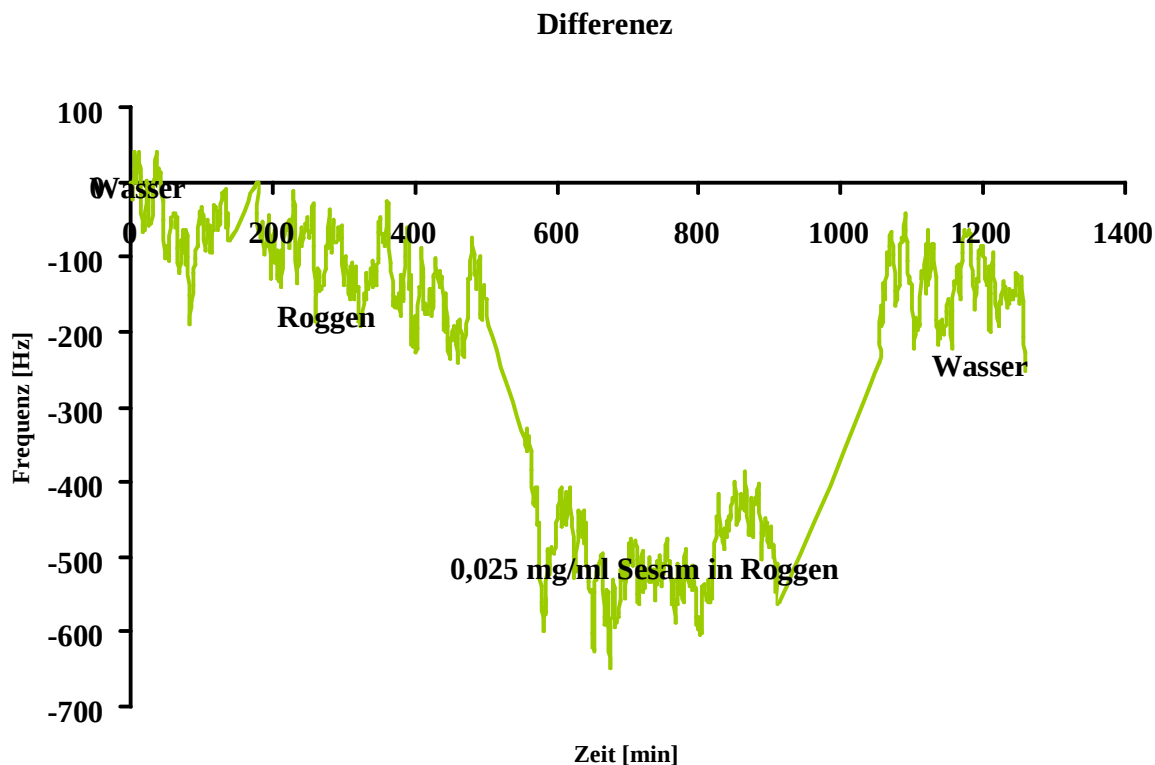


Abb. 88: Differenzkurve der Messung in Abb. 87

Wie man sieht, findet bei Zugabe des Roggenextraktes ohne Sesam keine spezifische Absorption statt. Es kommt lediglich zu einer unspezifischen Absorption, die auf der Messelektrode und der Referenz gleich ist (in der Differenzkurve also null). Enthält die Probe allerdings Sesam, bleibt der unspezifische Effekt bei der Referenz beinahe gleich. Die Messelektrode spricht deutlich stärker an. Es konnte also Sesam in Roggen detektiert werden (berücksichtigt man die Verdünnung der Probe mit so wäre die Konzentration in der unverdünnten Probe 6,4 mg/ml).

Weiters wurde versucht in Mohnextrakt zu messen. Auch Mohn kann in realen Proben vorkommen. Der Extrakt hatte eine Proteinkonzentration von 18,0 mg/ml (photometrisch bestimmt mit der Methode nach Bradford).

Messen von Sesamprotein in Mohnextrakt

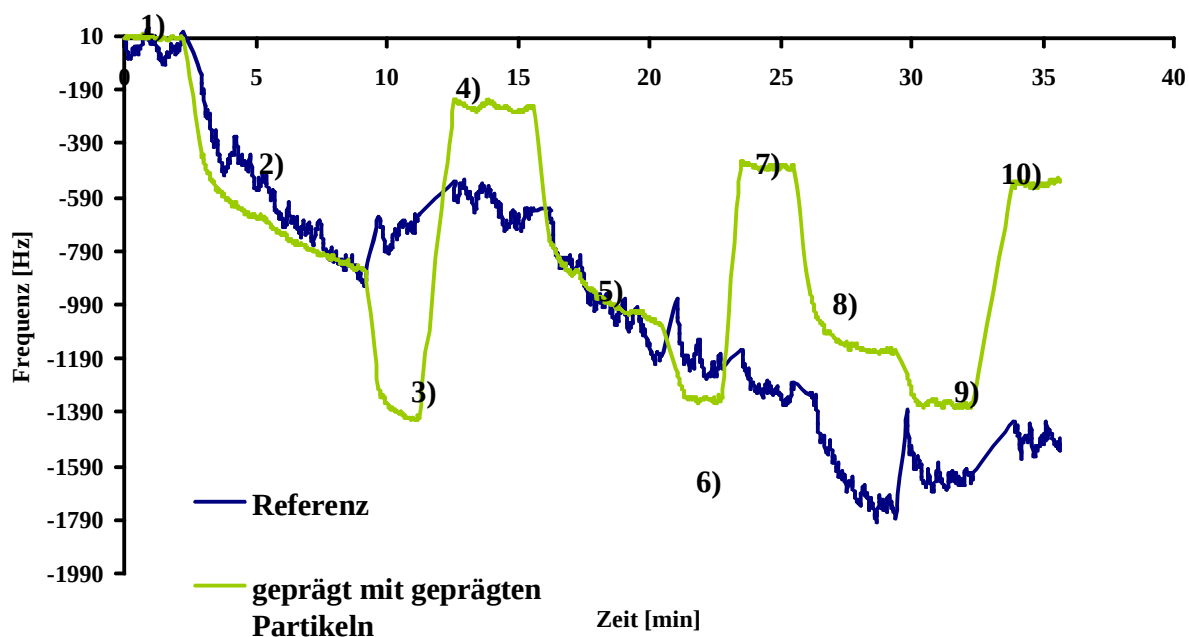


Abb. 89: QMB-Messung mit künstlichen Antikörpern (aus Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden) einer Mohnextraktprobe also blank mit verschiedenen Konzentrationen an Sesamprotein 1) Wasser 2) Mohn 3) Mohn + Sesam 0,027 mg/ml 4) Wasser 5) Mohn 6) Mohn + Sesam 0,014 mg/ml 7) Wasser 8) Mohn 9) Mohn + Sesam 0,007 mg/ml 10) Wasser

In Abb. 89 wird die Messung verschiedener Konzentrationen von Sesamprotein in Mohnextrakt gezeigt. Dabei kommt es auch mit dem Mohnextrakt, der verglichen mit dem Sesamprotein im Überschuss vorliegt (1:256 verd), zu einer Querempfindlichkeit. Dieses Problem lässt sich lösen, indem man jeweils eine Blindprobe mit der gleichen Konzentration an Mohn misst. Auch Sonnenblumenkernextrakt wurde als vereinfachte Matrix verwendet. Der Extrakt hatte eine Proteinkonzentration von 16,0 mg/ml (photometrisch bestimmt mit der Methode nach Bradford).

Messen von Sesam in Sonnenblumenkernextrakt

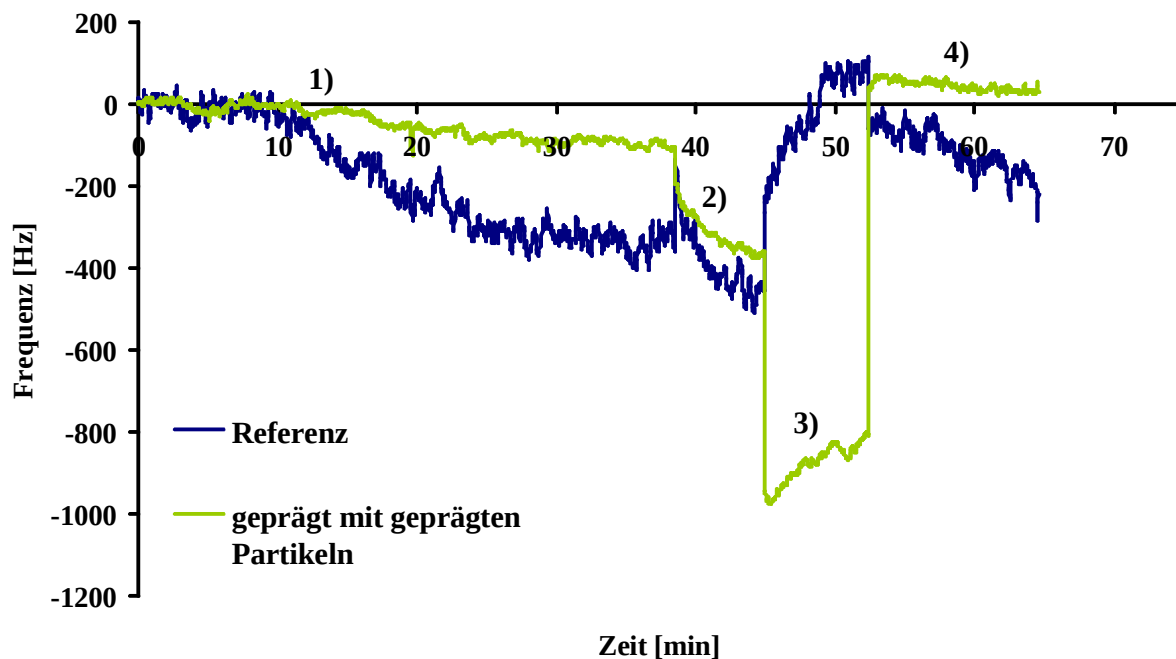


Abb. 90: QMB-Messung mit künstlichen Antikörpern aus Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt sind. Messung einer Probe von Sonnenblumenkernextrakt (1 mg/ml) ohne und mit Sesamprotein 1) Wasser 2) Sonnenblumenkernextrakt 3) Sonnenblumenkernextrakt + Sesam (0,44 mg/ml)

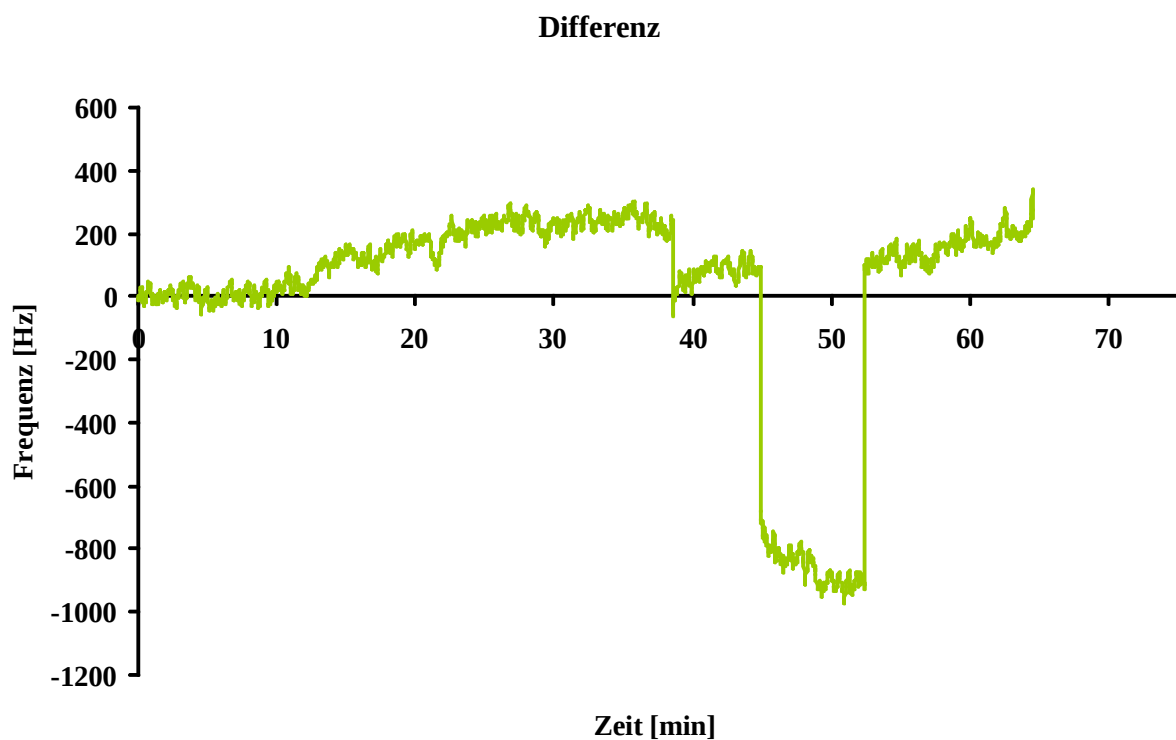


Abb. 91: Differenzkurve der in Abb. 90 gezeigten Kurve

Die Abbildungen (Abb. 90, Abb. 91) zeigen, dass die Messung in Sonnenblumenextrakt möglich ist. Der Sonnenblumenextrakt, der im Überschuss vorhanden ist, zeigt nur wenig Querempfindlichkeit. Es wurde auch versucht in Weizenextrakt zu messen. Da der Extrakt selber auch spezifisch adsorbiert wird, misst man wiederum in der realen Matrix. Der Extrakt hatte eine Proteinkonzentration von 13,0 mg/ml (photometrisch bestimmt mit der Methode nach Bradford).

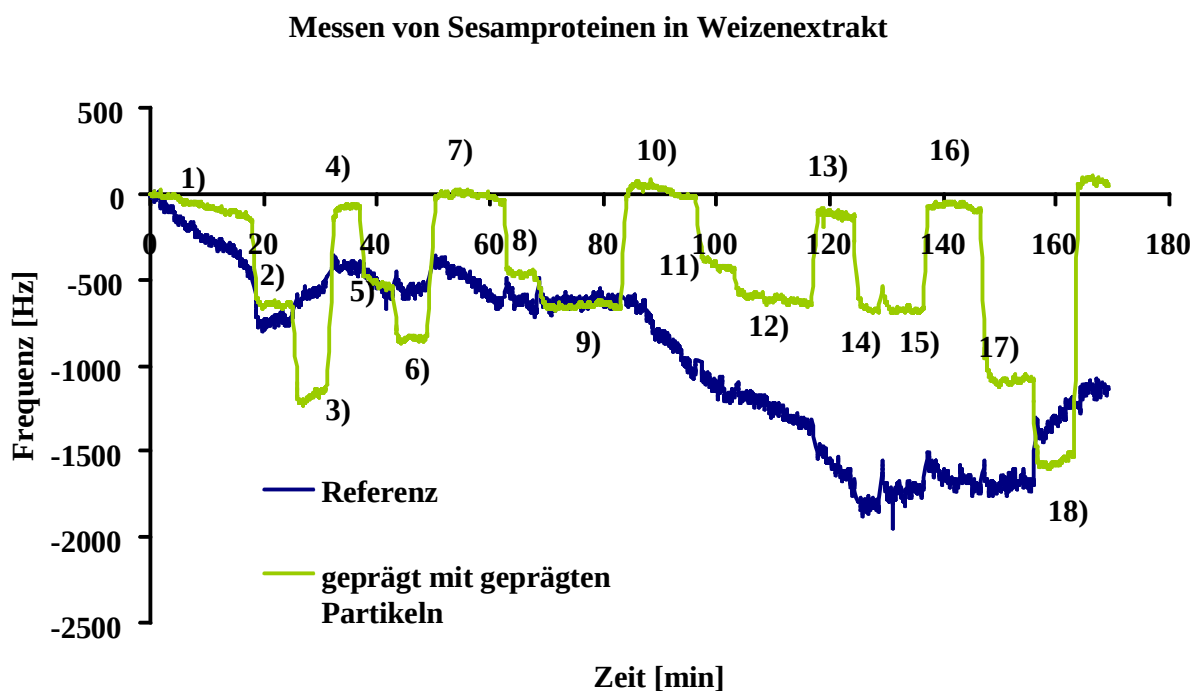


Abb. 92: QMB-Messung (aus Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden): von Weizenextrakt ohne Sesamprotein und Weizen gespiked mit verschiedenen Konzentrationen des Sesamproteins 1) Wasser 2) Weizenextrakt (0,05 mg/ml) 3) Weizenextrakt (0,05 mg/ml) + Sesam 0,027 mg/ml 4) Wasser 5) Weizenextrakt (0,05 mg/ml) 6) Weizen (0,05 mg/ml) + Sesam 0,014 mg/ml 7) Wasser 8) Weizenextrakt (0,05 mg/ml) 9) Weizen (0,05 mg/ml) + Sesam 0,007 mg/ml 10) Wasser 11) Weizenextrakt (0,05 mg/ml) 12) Weizen (0,05 mg/ml) + Sesam 0,004 mg/ml 13) Wasser 14) Weizenextrakt (0,05 mg/ml) 15) Weizen (0,05 mg/ml) + Sesam 0,002 mg/ml 16) Wasser 17) Weizenextrakt doppelte Konzentration (0,10 mg/ml) 18) Weizen doppelte c + Ses 0,027 mg/ml (0,10 mg/ml) 19) Wasser

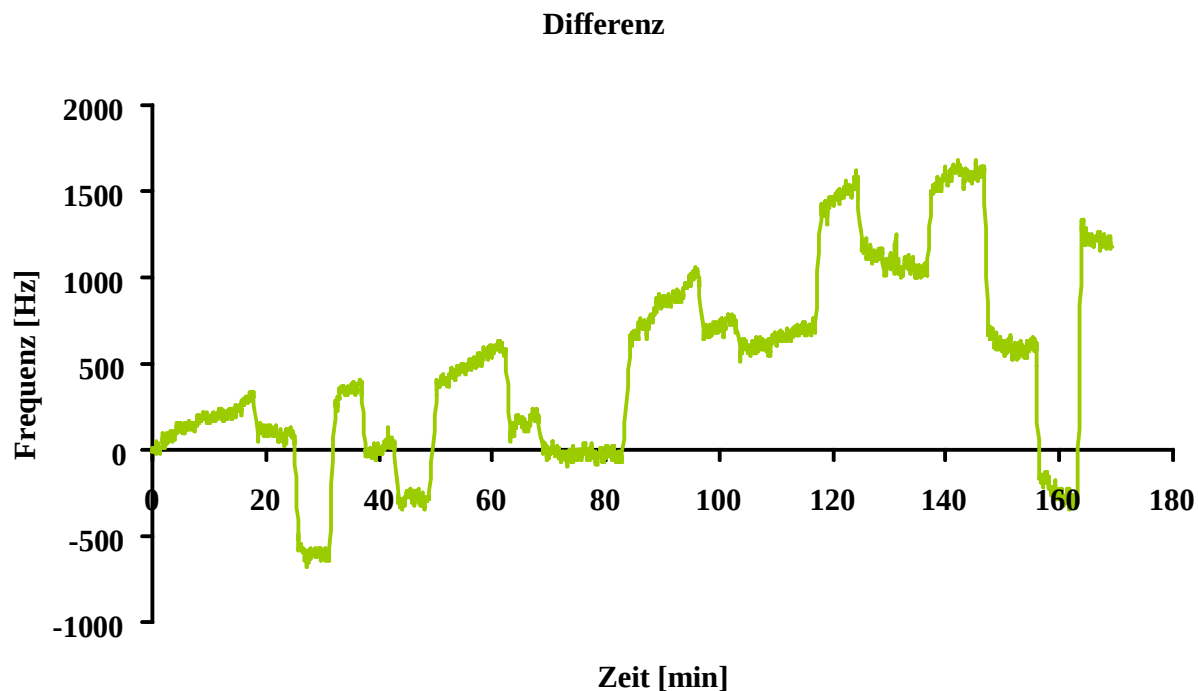


Abb. 93: Differenzkurve der in Abb. 92 gezeigten Messung

Man erhält bei gleichen Konzentrationen der Matrix einen von der Sesamproteinkonzentration abhängigen Messeffekt. Schließlich wurde als Realprobe in dem Extrakt eines Vollkornbrot (Ströck) gemessen.

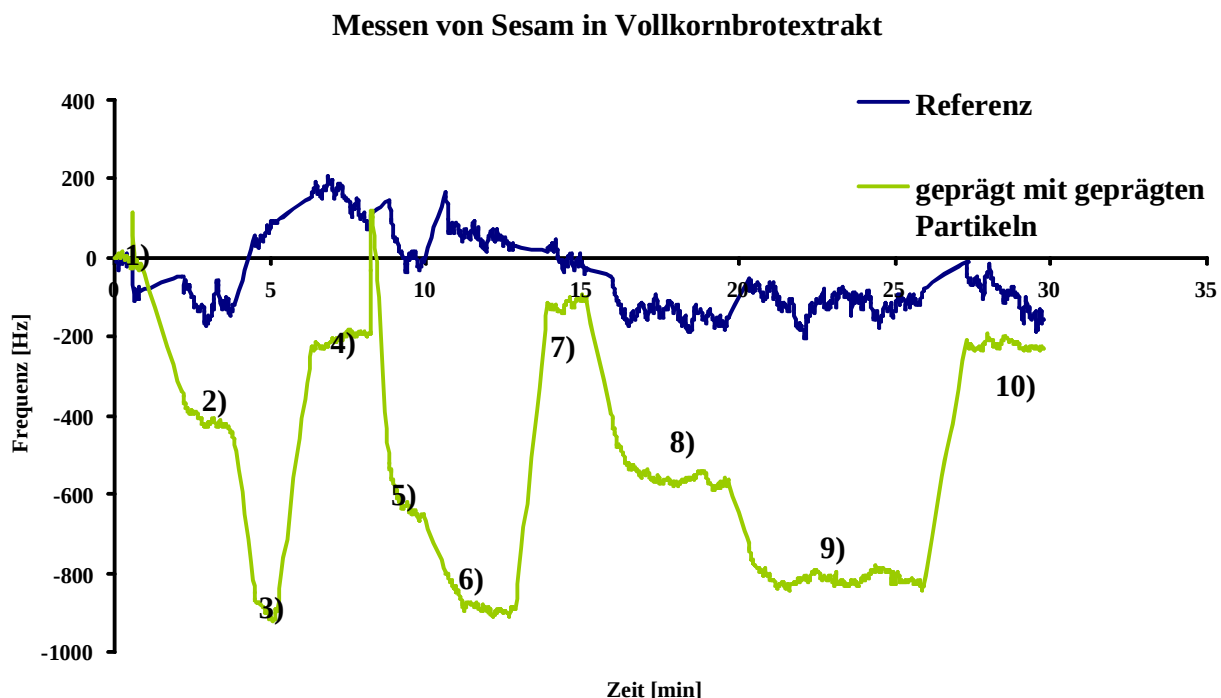


Abb. 94: QMB-Messung auf künstlichen Antikörpern von Sesamprotein in einer Realprobe (Vollkornbrot (Ströck)) 1) Wasser 2) Vollkornbrotextrakt 3) Vollkornbrotextrakt + Sesam (0,027 mg/ml) 4) Wasser 5) Vollkornbrotextrakt 6) Vollkornbrotextrakt + Sesam (0,014 mg/ml) 7) Wasser 8) Vollkornbrotextrakt 9) Vollkornbrotextrakt + Sesam (0,007 mg/ml) 10)

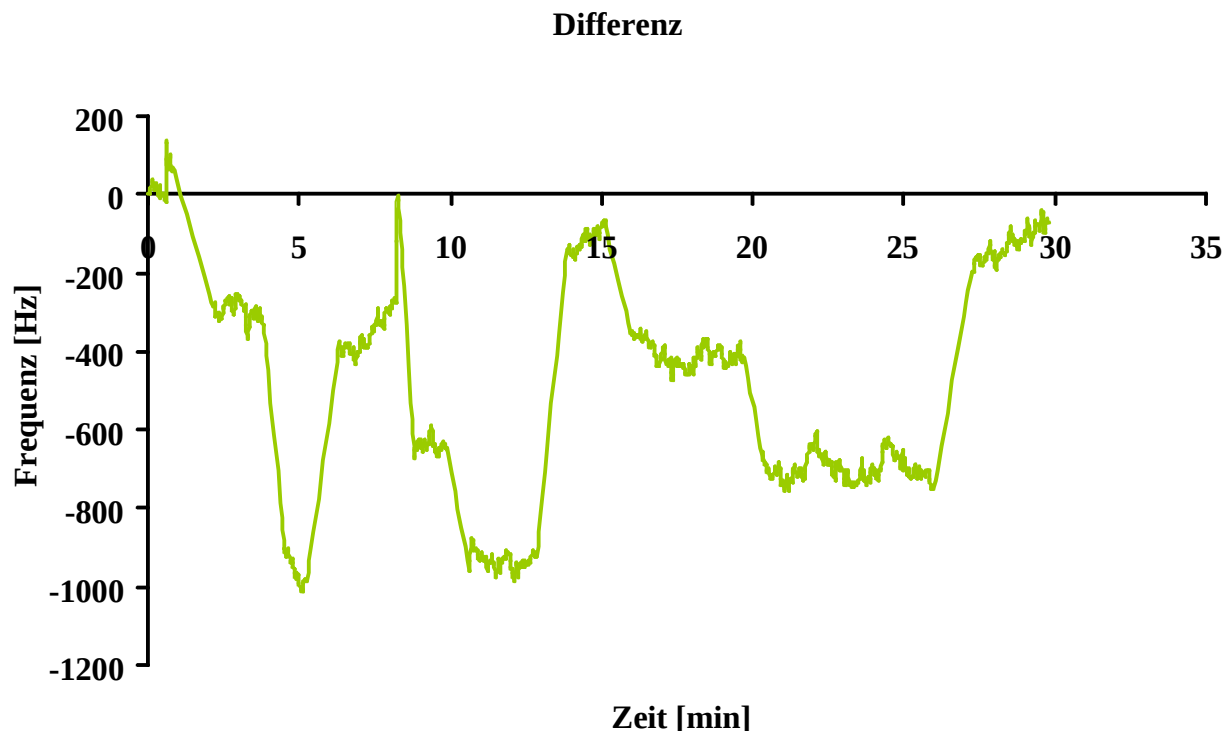


Abb. 95: Differenzkurve der in Abb. 94 dargestellten Messung

Wie in den Abb. 94 und Abb. 95 ersichtlich, zeigt auch der Extrakt des Vollkornbrotes einen bestimmten spezifischen Effekt. Wenn man aber den Nullwert, also den Messeffekt des Vollkornbrotes kennt, kann man die Konzentration des Sesamproteins messen.

Direkte Prägung von Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer mit Sesamprotein und Paranussprotein

Es sollte das Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer direkt mit Sesamprotein und Paranussprotein geprägt werden, um zu zeigen, dass die ausgezeichnete Empfindlichkeit für die Sesamproteine und die geringen Querempfindlichkeiten zu anderen Proteinen nicht durch eine höhere Affinität des Polymers zu Sesamproteinen begründet ist. Dazu wird der Proteinextrakt auf einen Glasstempel (5 μ l auf ein 5x5 mm Glasplättchen) aufgetragen und eine Stunde in den Kühlschrank (4°C) gelegt, damit die Proteine assemblieren können. Danach wird die überstehende Lösung abgespinnt, um die Bildung von Pufferkristallen auf der Oberfläche zu vermeiden. Für den Prägeprozess werden 5 μ l des Polymers (genaue Zusammensetzung und Herstellung siehe Tabelle 1) gleichmäßig über beide Elektroden

eines Schwingquarzes verteilt und bei 3000 rpm abgespinnt. In diese Polymeroberfläche wird der Stempel mit den Proteinen gedrückt und über Nacht bei Raumtemperatur mit einer Klammer fixiert, damit das Polymer aushärten kann. Nach Abnehmen des Stempels wird der Quarz in die Messzelle integriert und etwa 5-mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Ergebnisse der anschließenden QMB-Messung sind in den Abbildungen Abb. 96, Abb. 97, Abb. 98, Abb. 99 und Abb. 100 dargestellt.

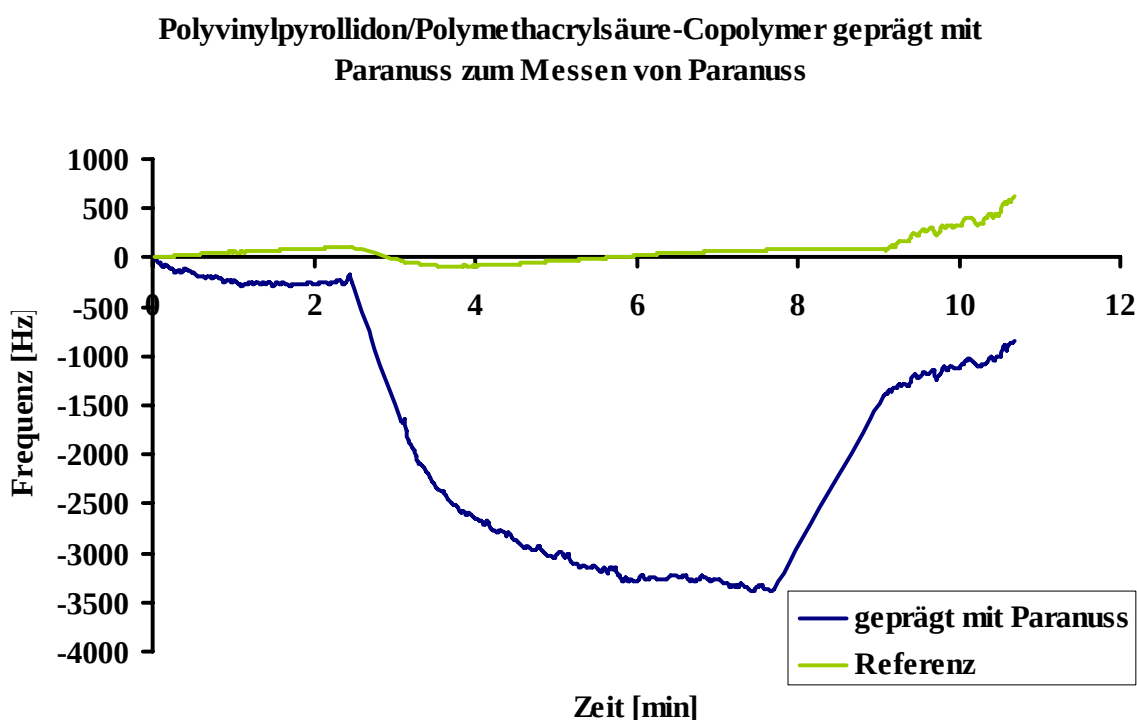


Abb. 96: QMB-Messung einer Schicht aus Polyvinylpyrrolidon/Polymethacrylsäure-Copolymer, **direkt geprägt** mit Paranussprotein, zum Messen von Paranussprotein (0,43 mg/ml) mit einem 10 MHz QMB

Mit Paranuss geprägte Schicht zum Messen von Sesamprotein

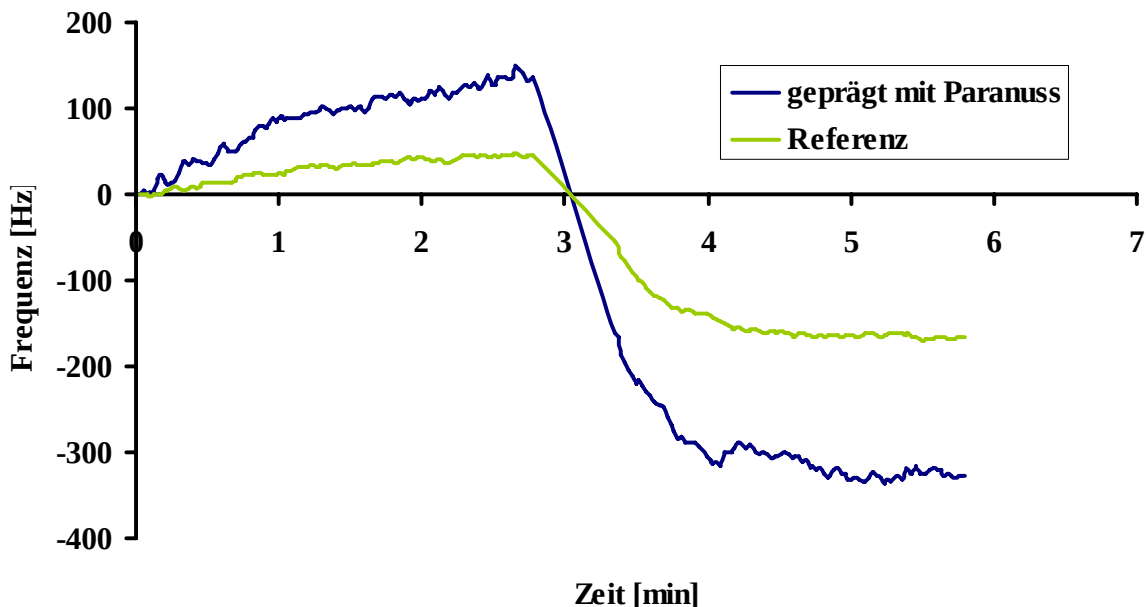


Abb. 97: QMB-Messung einer Schicht aus Polyvinylpyrrolidon/Polymethacrylsäure-Copolymer, **direkt geprägt** mit Paranussprotein, zum Messen der Querempfindlichkeit mit Sesamprotein (0,43 mg/ml)

Polyvinylpyrrolidon/Polymethacrylsäure-Copolymer geprägt mit Sesamprotein zum Messen von Sesamprotein

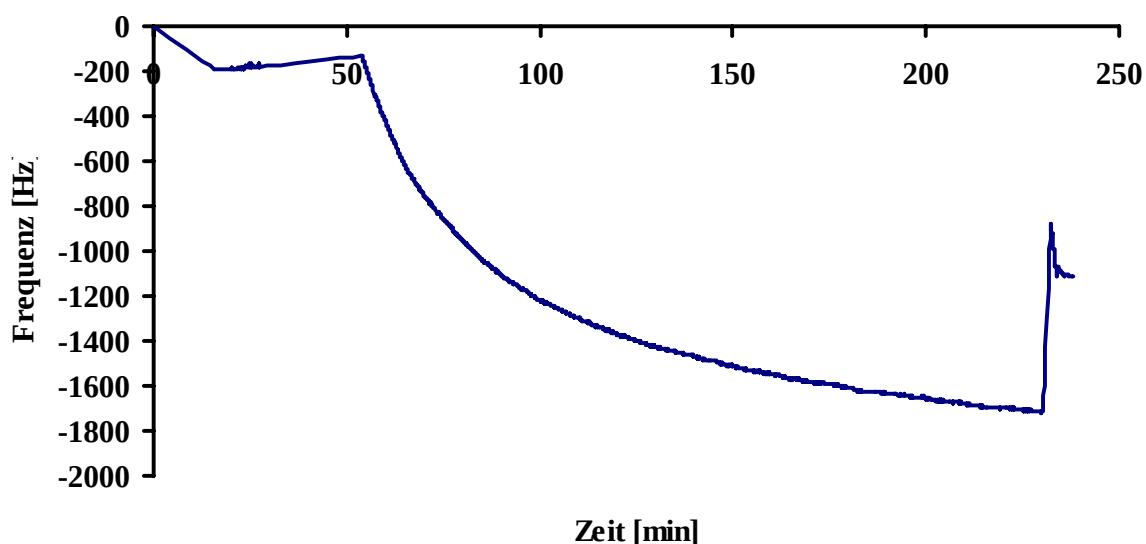


Abb. 98: Polyvinylpyrrolidon/Polymethacrylsäure-Copolymer, **direkt geprägt** mit Sesamprotein, zum Messen von Sesamprotein (0,43 mg/ml)

Mit Paranuss geprägte Schicht zum Messen von Sesam

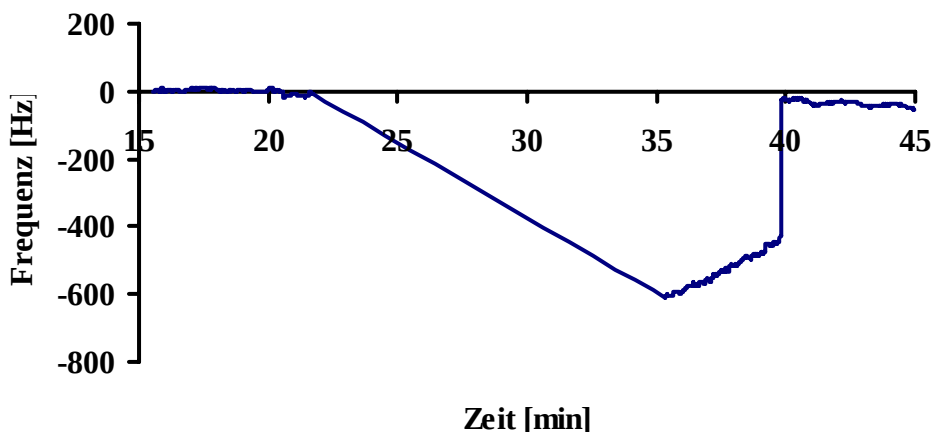


Abb. 99: Polyvinylpyrrolidon/Polymethacrylsäure-Copolymer, **direkt geprägt** mit Sesamprotein, zum Messen der Querempfindlichkeit zu Paranussproteinen (0,43 mg/ml)

Aus Abb. 96, Abb. 97, Abb. 98 und Abb. 99 ist ersichtlich, dass sowohl für Sesamproteine als auch Paranussproteine eine gute Querempfindlichkeit erreicht werden kann. Der Messeffekt des Polymers, geprägt mit Paranussprotein, zu seinem Templat ist sogar etwas größer, als der der mit Sesamprotein geprägten Schicht zu ihrem Analyten. Das Polymer an sich besitzt also keine höhere Affinität für Sesamproteine.

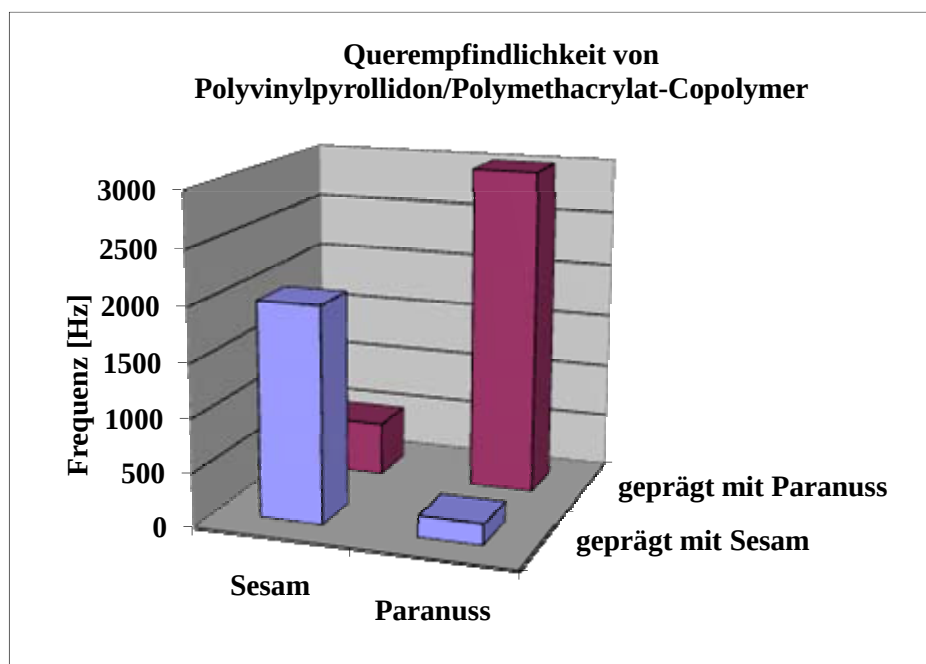


Abb. 100: Balkendiagramm mit Vergleich der Messeffekte für Paranuss und Sesam, jeweils mit Sesamprotein und mit Paranussprotein **direkt geprägt**

Versuche zur Wiederverwendung der Nanopartikel

Um den Bedarf an natürlichen Antikörpern zu verringern, wurde getestet, ob die Stempel mit den geprägten Partikeln wiederverwendet werden können. Antikörper können sehr teuer sein. Für die Ausweitung der Methode auf andere Analyte ist daher ein geringer Antikörperverbrauch besonders wichtig. Zusätzlich führt die Wiederverwendung des Stempels zu einer Arbeitersparnis und einer Standardisierung des Prägeprozesses. Nach den AFM-Bildern zu urteilen, bleiben die Partikel auf dem Glas haften.

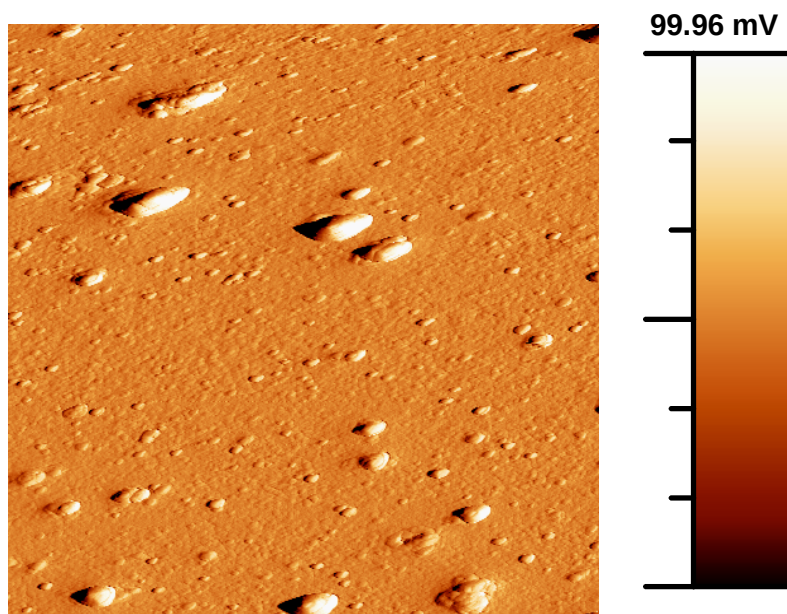


Abb. 101: Stempel für die Herstellung künstlicher Antikörper für die Detektion von Sesamproteinen nach Verwendung

Man verwendet die Stempel nach Gebrauch nochmals für die Prägung und misst die Einlagerung des Antigens. Um auch hier die Querempfindlichkeit nochmals zu überprüfen, misst man zusätzlich noch die Lösung eines anderen Proteins.

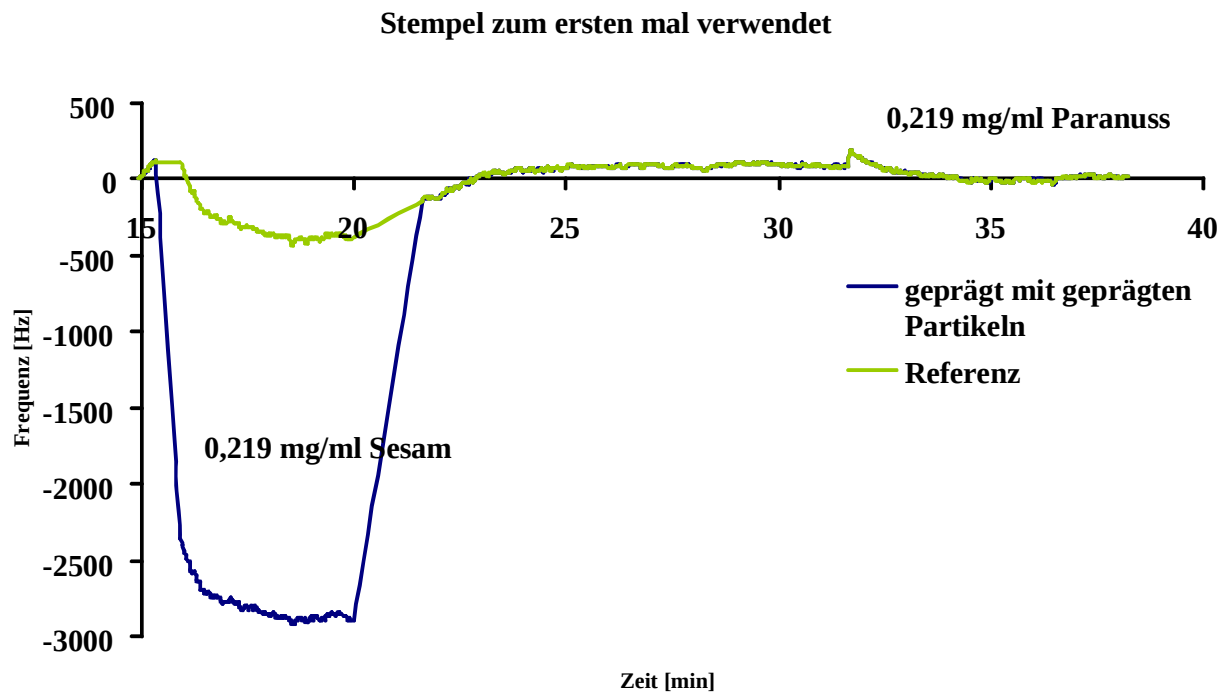


Abb. 102: QMB-Messung von Sesamproteinen mit künstlichen Antikörpern (aus Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden): Stempel wurde zum ersten Mal verwendet

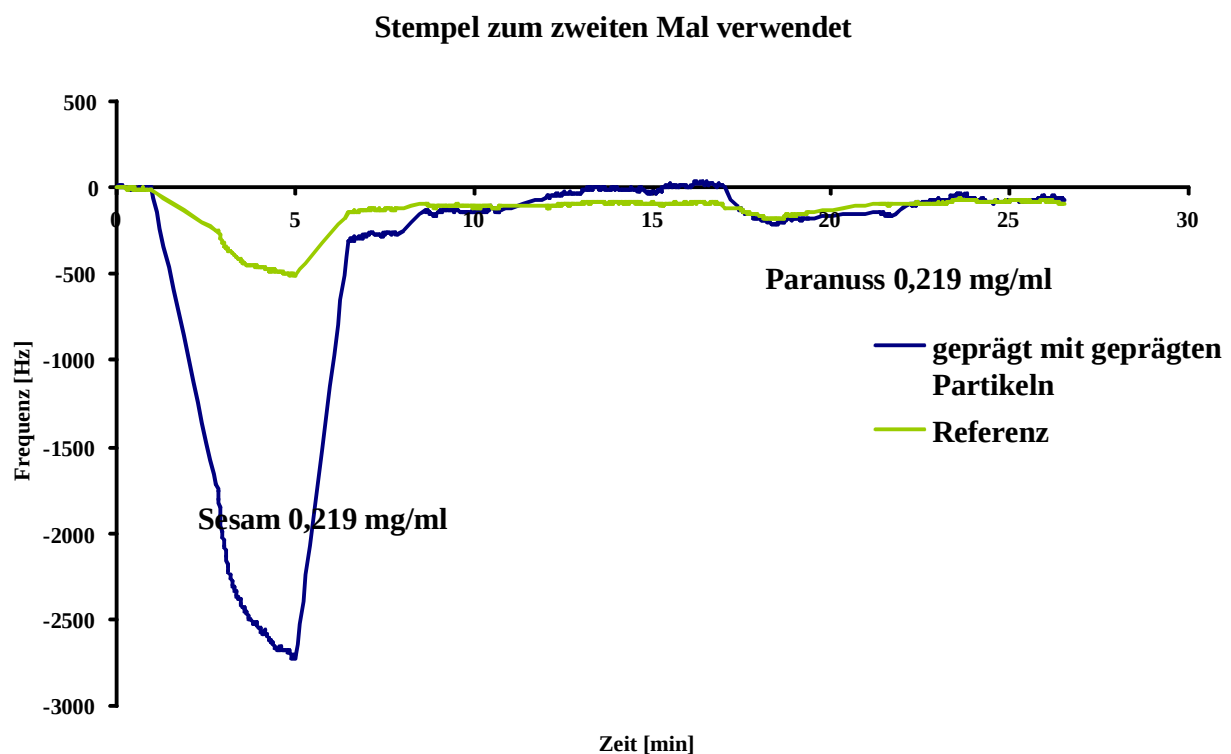


Abb. 103: QMB-Messung mit künstlichen Antikörpern: Stempel wurde zum zweiten Mal verwendet. Man sieht, dass der Messeffekt und auch die Querempfindlichkeit sich

nicht verschlechtert haben. Es ist daher möglich, den Stempel mehrmals zu verwenden.

Abb. 102 und Abb. 103 zeigen die QMB-Messkurven beim ersten und zweiten Versuch mit demselben Stempel. Wie man sieht unterscheiden sich die Messeffekte kaum, die Querempfindlichkeit bleibt minimal. Man kann einen Stempel also mehrmals verwenden und somit den Antikörperbedarf erheblich verringern. Außerdem kann der Prägeprozess durch Verwendung des gleichen Stempels standardisiert werden.⁵⁶

Diskussion

Wie aus Abb. 104 ersichtlich, konnten sehr geringe Querempfindlichkeiten erzielt werden. Abgesehen von den Erdnussproteinen, die sowohl bei der Messung mit künstlichen als auch mit den natürlichen Antikörpern eine Querempfindlichkeit zeigen, wurde bei allen Proben mindestens eine um einen Faktor 5 höhere Sensorantwort erzielt mit dem Sesamprotein. Die hohen Effekte mit Erdnussproteinen sind auf die Ähnlichkeit der Sesamproteine mit Erdnussproteinen zurückzuführen.

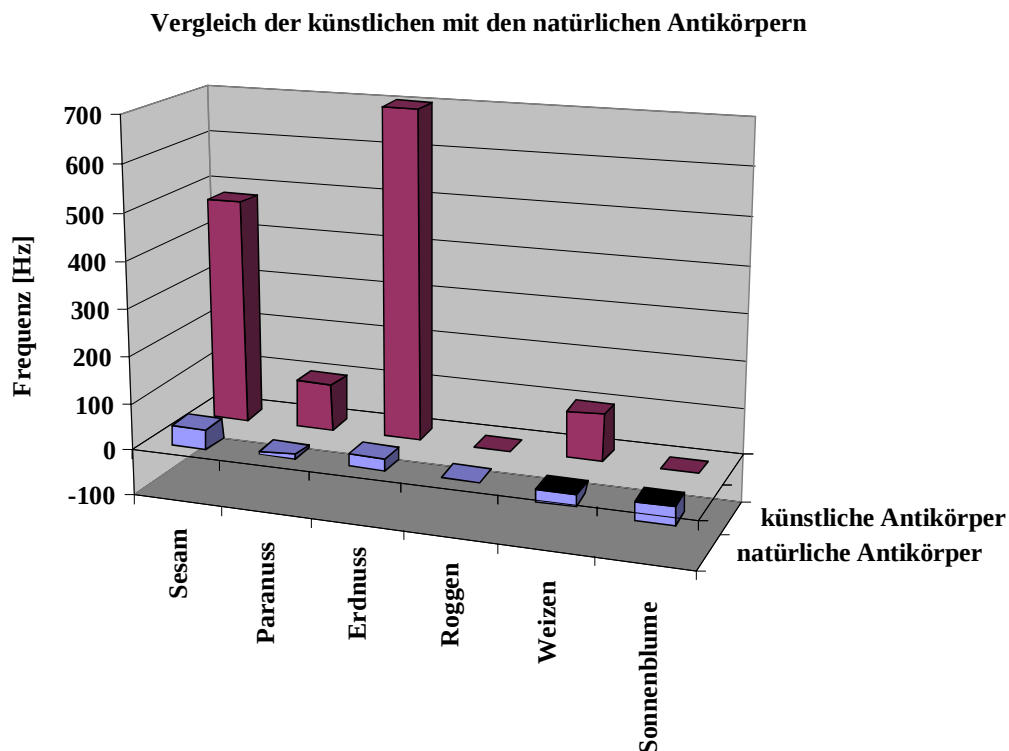


Abb. 104: Messeffekte mit verschiedenen Extrakten im Vergleich

Es konnten mit den künstlichen Immunglobulinen um einen Faktor 12 höhere Messeffekte und damit eine niedrigere Detektionsgrenze (0,0002 mg/ml) erreicht werden. Ein Messeffekt von fast 3000 Hz entspricht einer Schichtdicke von 120 nm, was die Dicke einer Monolage übersteigt. Dieses überraschende Ergebnis kommt zum einen durch die größere Oberfläche der Partikel zustande und zum anderen dadurch, dass ähnlich einem Kristallisationskeim die Anlagerung von Proteinen zu einer weiteren Anlagerung führt. Dieses Phänomen wurde auch schon für andere Proteine gefunden.⁵⁷

Zusammenfassung (künstliche Antikörper)

Das Ziel dieser Arbeit war es, künstliche Antikörper aus einem Polymer herzustellen, dem Trend in der Chemie folgend, labile natürliche Materialien gegen robuste synthetische zu ersetzen.

Dazu stellt man zuerst Nanopartikel mit Abdrücken von Immunglobulinen her, die später zum Prägen einer Schicht auf einem Schwingquarz verwendet werden. Man polymerisiert mit dem Templat gemeinsam vor und fällt dann aus Acetonitril Partikel aus. Der Grund für die Verwendung von Nanopartikeln liegt darin, dass sie wegen ihrer Größe eine geringe Wechselwirkungsfläche mit dem Polymer haben und so reversibel gebunden werden können. Um Partikel der passenden Größe zu erhalten, stellte sich ein Polyvinylpyrrolidon/Polymethacrylsäure-Copolymer (60 mg DHEBA, 50 mg Methacrylsäure, 20 mg Vinylpyrrolidon in 800 µl Wasser) als günstig heraus. Dieses Polymer wurde gewählt, weil die Monomere in Wasser löslich sind und damit in Wasser vorpolymerisiert werden kann, sodass der wasserlösliche, in organischen Lösungsmitteln nicht stabile Antikörper an das Polymer gebunden wird. Acetonitril hat sich als günstiges Lösungsmittel erwiesen, um Partikel auszufällen, da es sich mit Wasser mischt und mit fortschreitender Polymerisation die Löslichkeit überschritten wird und Partikel ausfallen. Eine Konzentration von 5-10 ml Präpolymerisat pro Liter Lösungsmittel wurde in den Versuchsserien als besonders günstig ermittelt. Dass die ausgefällten Partikel den Antikörper binden, wurde durch 3 unabhängige Methoden, nämlich mittels UV-Messung (siehe Abb. 29), Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abb. 28) und mit einer Farbreaktion (siehe Abb. 25), gezeigt. Der Antikörper wurde nachweislich wieder aus den Partikeln ausgewaschen. Schließlich wurden die modifizierten Partikel verwendet, um Abdrücke in Form von Antikörpern auf einen Quarz zu prägen. Als Polymer für das Coating findet wieder ein Polyvinylpyrrolidon/Polymethacrylsäure-Copolymer Verwendung, da es mit dem Polymer der Partikel Wasserstoffbrücken ausbilden und sich so der Struktur des Polymers genau anpassen kann. Die Abdrücke wurden mit einem Stempel aus Glas gemacht. Die Partikel haften wegen ihrer Hydrophilie gut am Glas und bleiben beim Abnehmen des Stempels nicht im Polymer zurück. Die Funktion der so gewonnenen

künstlichen Antikörper sollte nun durch ihre Reaktion mit Viren, Sesamproteinen oder anderen Immunglobulinen getestet werden. Dazu wurden zuerst die natürlichen Antikörper auf einer Goldoberfläche immobilisiert und die Frequenzänderung eines Schwingquarzes bei der Anlagerung von Viren oder Proteinen an sie gemessen (siehe Abbildungen: **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, Abb. 19 und Abb. 64). Schließlich wurden die gleichen Messungen mit den künstlichen Antikörpern durchgeführt und eine Anlagerung der Viren oder Proteine gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass auch die künstlichen Antikörper die Analyte gleich spezifisch binden wie die natürlichen Analoga. Dies lässt darauf schließen, dass die Abdrücke tatsächlich nicht nur die erwünschte Form der natürlichen Antikörper haben, sondern auch ihre chemische Funktionalität übertragen werden kann. Auch konnte gezeigt werden, dass die so erhaltenen Sensoren auch in anderen Matrices funktionieren (siehe Abb. 42, Abb. 44, Abb. 87, Abb. 89, Abb. 90, Abb. 92 und Abb. 94). Durch zahlreiche Optimierungsschritte wurde der Probenbedarf verringert und die Prägung standardisiert, die Option der mehrfachen Verwendung eines Stempels (siehe Abb. 102 und Abb. 103) stellt einen wichtigen Schritt für die industrielle Anwendbarkeit dar.

Sensoren für TMV und Überprüfung ihrer Güte mittels Fluoreszenzmikroskopie

Herstellung der Stempel

Es sollte mit TMV die Güte des verwendeten Polymersystems für molekulares Prägen geprüft werden. Das Konzept dahinter ist, dass man eine Polymerschicht mit Viren prägt, die Viren wieder auswäscht und dann mittels Fluoreszenzmikroskopie misst, wie viel einer fluoreszenzmarkierten Virenlösung wieder eingelagert wird.

Die in der Arbeit verwendeten TMV Viren wurden aus eigens aufgezogenen und infizierten Pflanzen (*Nicotiana tabacum*) nach einer Vorschrift von Fraenkel et. al.

isoliert.⁵⁸ Zur Infektion werden die jungen Pflanzen mit etwa 4 Blättern mit Kieselgel gerieben, bis das Blatt durchscheinend wird. Dann tropft man die Virenlösung auf. Man färbt die Viren mit einem Fluoreszenzfarbstoff ein, in diesem Fall Dansylchlorid (5-(Dimethylamino)-naphthalin-1-sulfonylchlorid; DNSCl), welches mit der Aminogruppe einer Aminosäure reagiert unter Bildung einer fluoreszierenden Dansylaminosäure. Diese Sulfonamidderivate können noch in Konzentrationen bis zu 10^{-4} μmol nachgewiesen werden. Trifunktionelle Aminosäuren (wie zum Beispiel Cystein, Tyrosin, Lysin und Histidin) werden durch die Reaktion mit Dansylchlorid auch in der Seitenkette modifiziert.

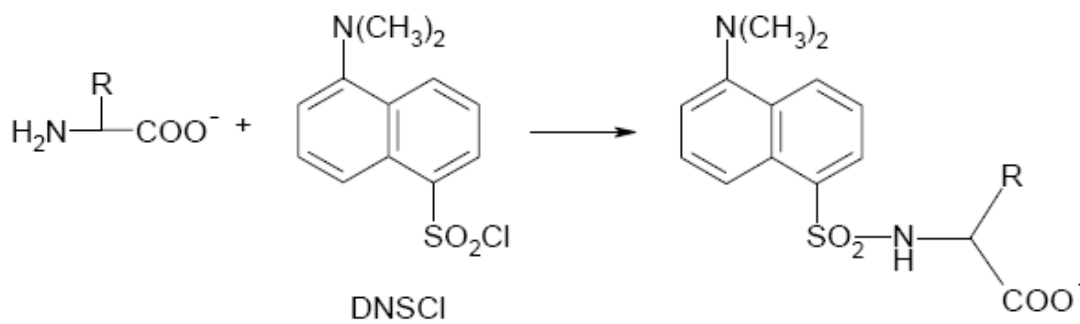


Abb. 105: Reaktion von Dansylchlorid mit Proteinen

Zum Markieren wurde eine Lösung von DNSCl in Wasser hergestellt (analog zu ^[1]). Da DNSCl in Wasser unlöslich ist, wurde es stattdessen in Ethanol gelöst (1,5 mg/ml). 50 μl dieser Lösung vermischt mit 50 μl einer Virenlösung einmal unverdünnt, 1:10 verdünnt und einmal 1:100 verdünnt mit Puffer ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH7). Die Konzentrationen aller Virenlösungen wurden mittels UV-Spektroskopie bestimmt.

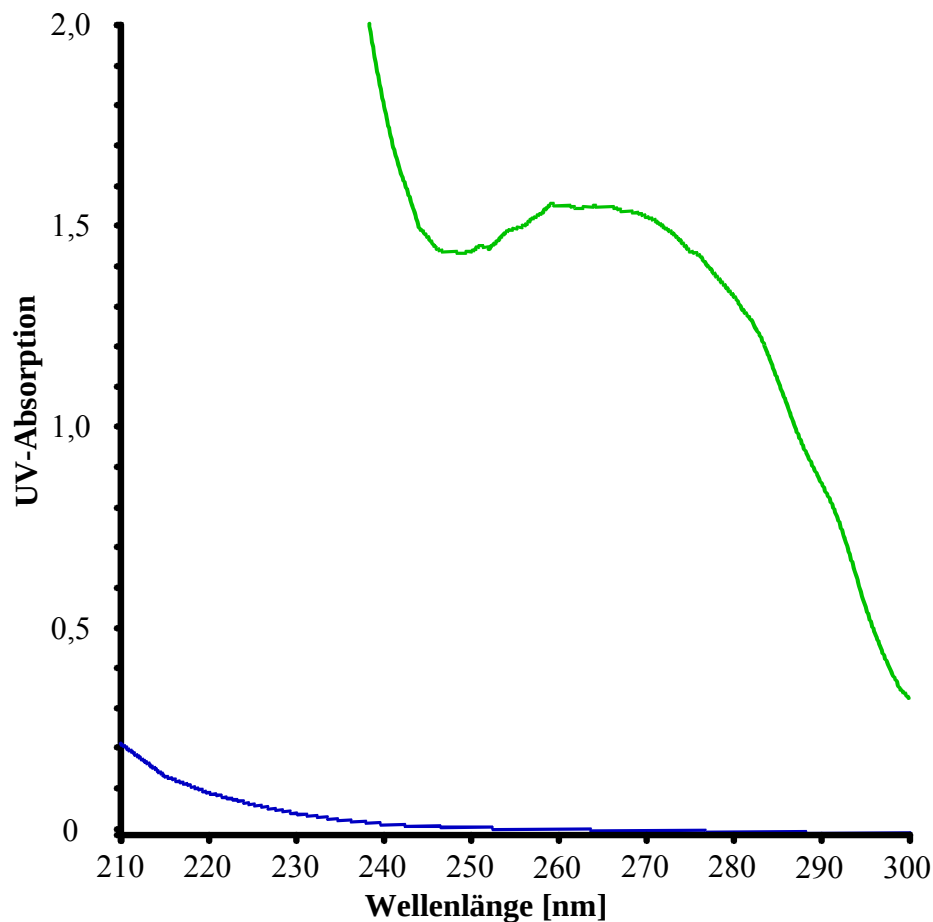


Abb. 106: UV-Messung der TMV in Puffer (grün) und 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ bei pH = 7 (blau)

Dabei wurde die Konzentration abgeschätzt durch Einsetzen in die Eichgerade⁵⁹:

$$[TMV] = \frac{(Abs) - 0,033}{2,315}, R^2 = 0,9976$$

Dabei ist DNSCL im Unterschuss vorhanden, damit möglichst wenig des Farbstoffes in der Lösung bleibt. Diese Mischungen wurden 30 min bei 37°C inkubiert. Mit diesen fluoreszenzmarkierten Viren (DNSCL reagiert mit den Kapsidhüllen der Viren) wurden verschiedene Versuche durchgeführt: die Viren wurden auf ein Glasplättchen aufgebracht: dazu werden auf ein etwa 5 x 5 mm großes Glasplättchen 5 µl der gefärbten Viren aufgetragen und eine Stunde bei 4°C gelassen, damit sich die Viren auf dem Glasplättchen assemblieren. Dann wurde der Rest der Lösung abgespinnt und das Ergebnis unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

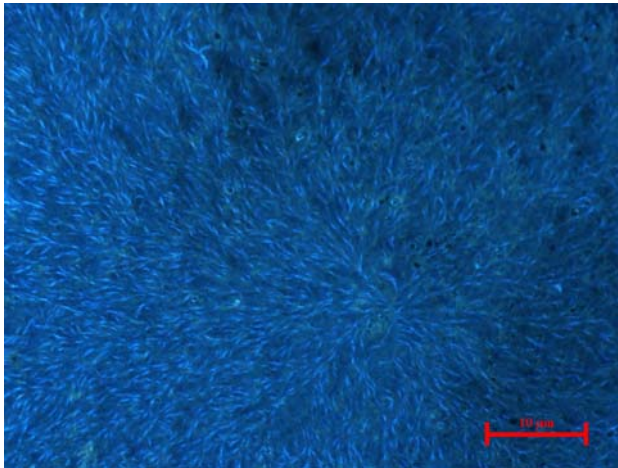


Abb. 107: Fluoreszenzmarkierte TM-Viren auf einem Glasplättchen, die Markierung entspricht einer Länge von 10 µm

Das Bild zeigt TMV auf dem Glasstempel, die mit Dansylchlorid markiert sind, 1:100 vergrößert. Das Fluoreszenzmikroskop verfügt über eine Software, mit der man die Helligkeit des jeweiligen Bildes bestimmen und somit quantifizieren kann. Zum Polymervergleich wurden Glasstempel mit verschiedenen Konzentrationen der markierten Viren hergestellt. Dazu färbt man verschieden konzentrierte Lösungen an und lässt sie auf einem Glasplättchen trocknen. Abhängig von der Konzentration der Lösung erhält man verschiedene Helligkeitsverteilungen der Fluoreszenzbilder.

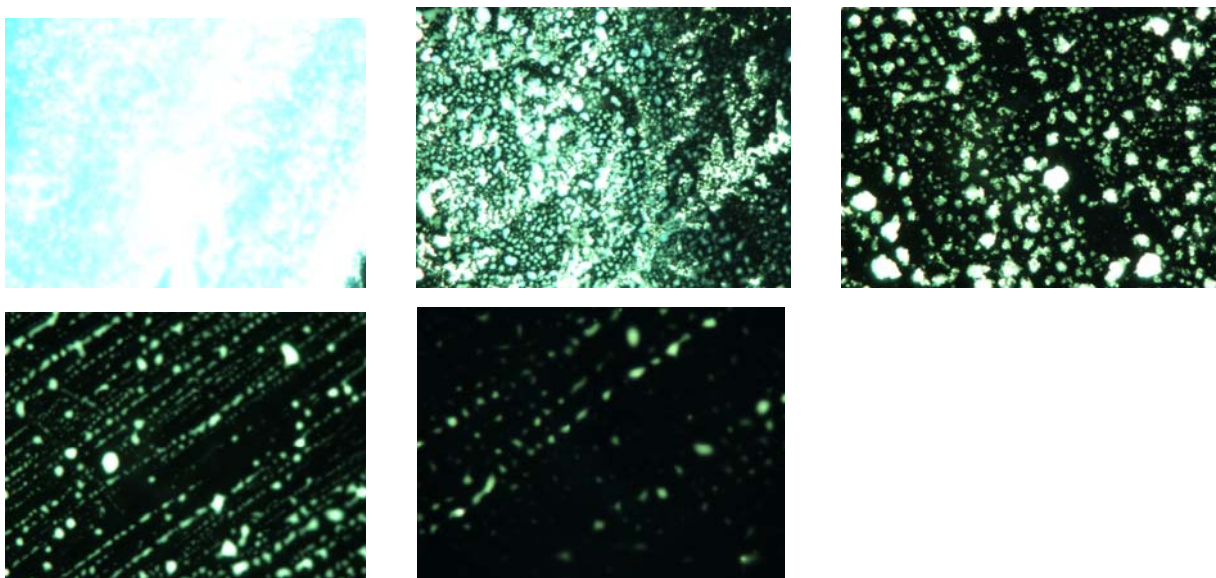


Abb. 108: Fluoreszenzmarkierte TMV in verschiedenen Konzentrationen (von links nach rechts 10000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 100 µg/ml, 10 µg/ml)

Man kann Bilder von verschiedenen konzentrierten Lösungen aufnehmen und die Helligkeiten vergleichen. Damit lässt sich später die Menge der absorbierten Viren besser quantifizieren.

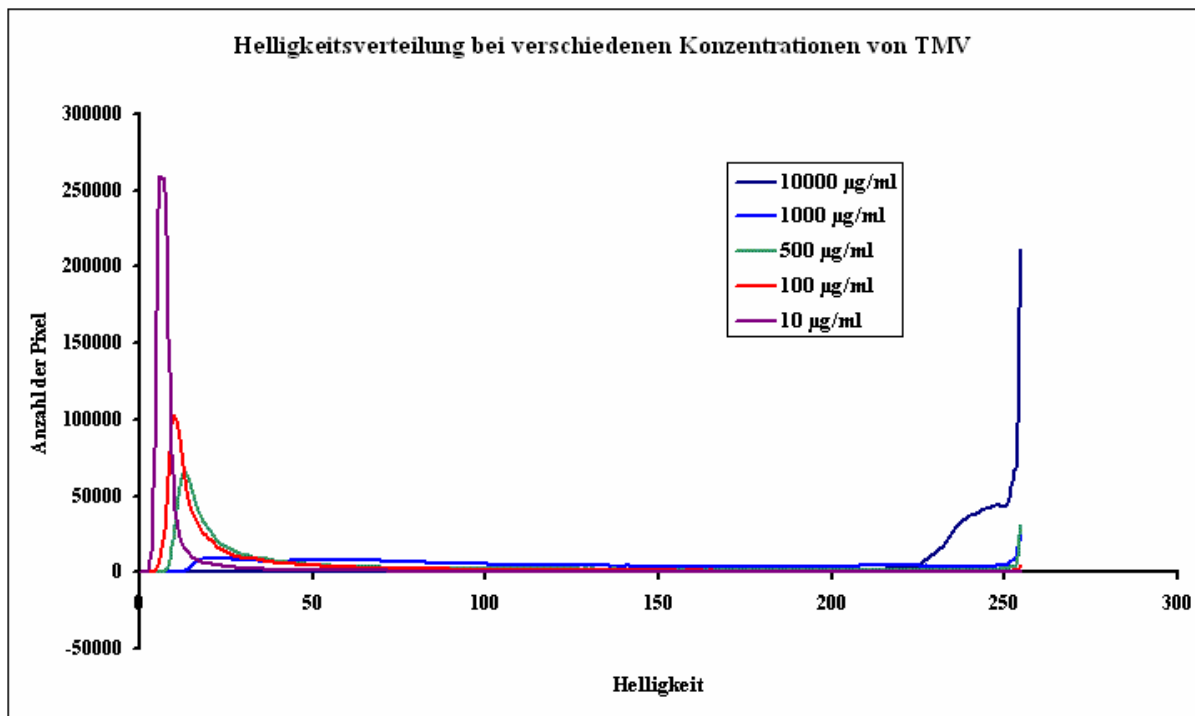


Abb. 109: Verteilung der Helligkeit von Fluoreszenzbildern von verschiedenen konzentrierten Virenlösungen. Im Bild ist die Helligkeit in Graustufen gegen die Häufigkeit der Pixel mit dieser Graustufe aufgetragen, wobei 0 schwarz entspricht und 255 weiß

Prägen mit Polyurethan

Herstellung der Sensoren und QMB-Messung

Für die Prägung wurde ein Stempel hergestellt. Dazu wurden auf ein etwa 5 x 5 mm großes Glasplättchen 5 µl der Viren (in K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH7) aufgetragen und eine Stunde bei 4°C assemblieren gelassen. Der Rest der Lösung wurde abgespinn und der Stempel unter dem AFM und unter dem Lichtmikroskop begutachtet.

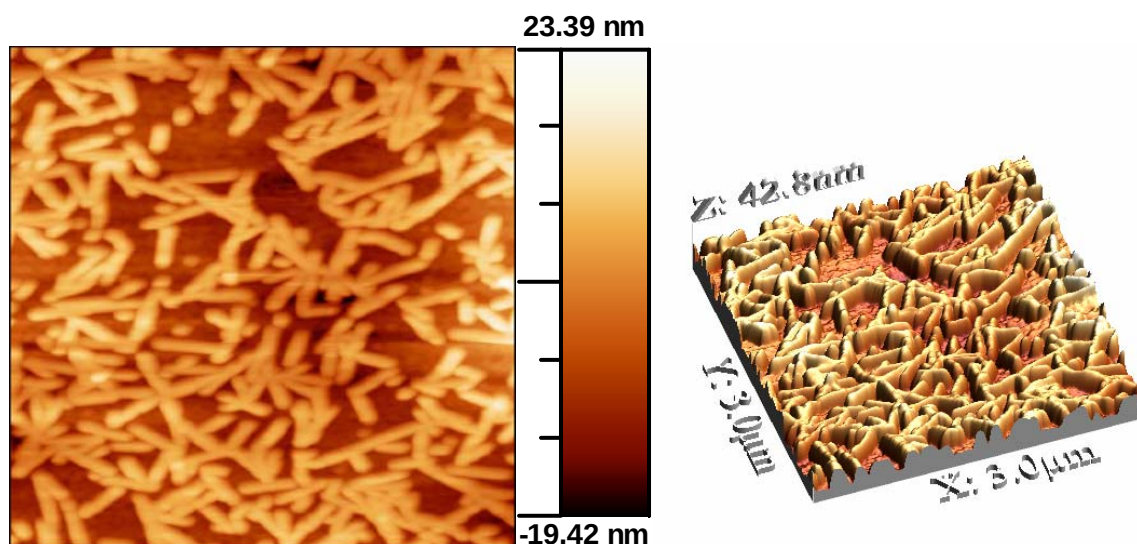


Abb. 110: AFM-Bild des Glasstempels für die Prägung mit TMV

	Polymer
Bisphenol A	46,8 mg
Phloroglucin	56 mg
MDI	97,2 mg
Pyridin	15 μl

Tabelle 9: Zusammensetzung des verwendeten Polymers

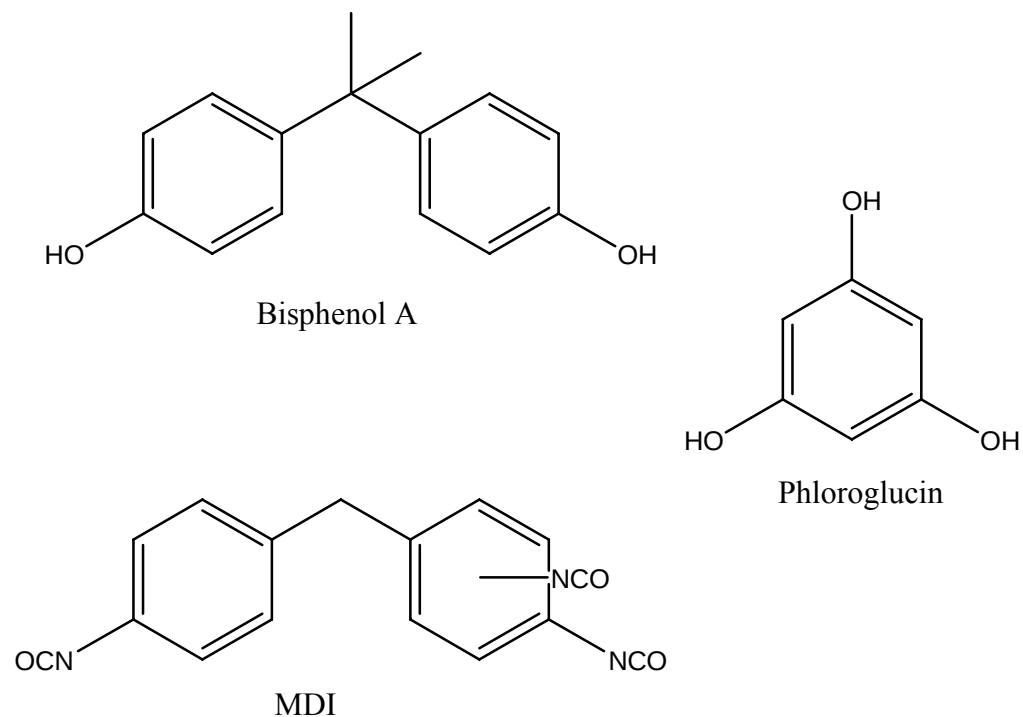


Abb. 111: Strukturformel der für das Polyurethan verwendeten Monomere

Die Monomere und der Starter (Pyridin) wurden in 200 μl THF (wasserfrei) gelöst und bei 70°C bis zum Gelpunkt polymerisiert. Dann gibt man weitere 800 μl THF zu. Statt THF kann man auch Dioxan als Lösungsmittel verwenden. Dieses hat einen höheren Siedepunkt als THF. Dies hat den Vorteil, dass man mehr Zeit für die Prägung hat, weil das Polymer nicht so schnell aushärtet. Dies ist gerade bei dünnen Schichten, die schnell trocknen und aushärten, wichtig. Das Polymer wurde auf ein Glasplättchen aufgetragen, abgespinnt (Spincoating) und ein Stempel mit assemblierten Tabakmosaikviren wurde hineingedrückt. Diesen lässt man über Nacht aushärten und löst ihn unter Spülung mit Wasser ab. Die Tabakmosaikviren sind dann noch an das Polymer gebunden

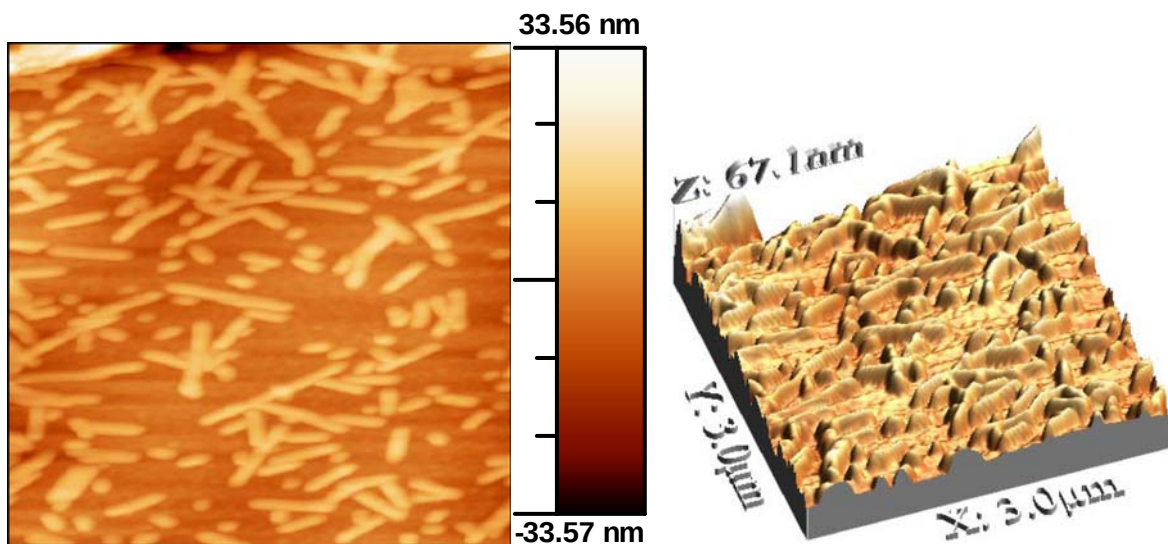


Abb. 112: Polyurethanoberfläche mit TMV vor dem Waschen

und werden herausgelöst durch kurzes Waschen mit 0,5 M HCl (dabei denaturieren die Proteine an der Oberfläche und die Viren sind leichter entfernbar). In den AFM-Aufnahmen ist ersichtlich, dass ein Großteil der Viren noch gebunden ist. Daher wurden die Proben mit Ultraschall behandelt und mit warmem Wasser gewaschen. Auch wurde versucht die Quarze mit dem Detergens SDS (Sodiumdodecylsulfat) zu waschen.

In gleicher Weise wurden auch Quarze geprägt. Es wurden mit Dithiothreitol behandelte und nackte Goldelektroden verwendet.

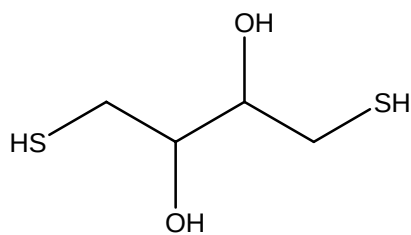


Abb. 113: Strukturformel von Dithiothreitol

Diese bekommt man, indem man die Quarze nach Aufbringen des Goldes in eine 5 %ige Lösung des Thiols in Toluol einlegt und über Nacht rühren lässt. Dies dient der besseren Haftung des Polymers am Gold, da das Thiol mit seinen Schwefelgruppen eine hohe Affinität zum Gold hat. Über die beiden zusätzlichen OH-Gruppen wird das Polymer gebunden und haftet somit besser. Dabei wurde festgestellt, dass die Viren sehr schlecht bis überhaupt nicht aus dem Polymer herausgelöst werden können.

Um die Viren später besser aus dem Polymer entfernen zu können wurden sie nach Assemblieren auf dem Stempel mit 5 µl einer 4 mM Glukoselösung überschichtet, einige Minuten erneut bei 4°C assemblieren gelassen und wieder abgespinnt. Man erhält einen Stempel, auf dem die Viren mit einer Glukoseschicht bedeckt sind.

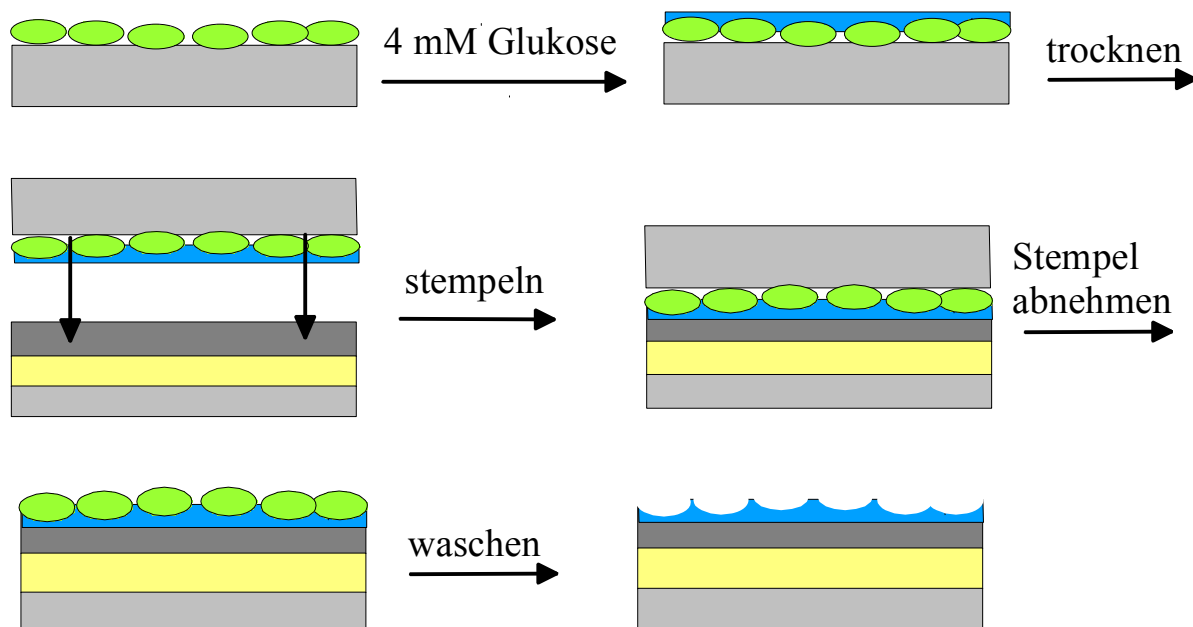


Abb. 114: Prinzip der Prägung mit TMV auf Polyurethan: im ersten Schritt werden die Viren auf einem Glasplättchen assemblieren gelassen, dann wird mit Glukoselösung überschichtet, damit der Virus nicht kovalent in das Polymer eingebunden wird; schließlich wird die Probe trocknen gelassen und in das noch weiche Prepolymerisat gedrückt. Man lässt aushärten und nimmt den Stempel ab und der Virus kann mit SDS ausgewaschen werden.

Durch das Aufbringen einer Modifizierschicht kann verhindert werden, dass der Analyt kovalent in das Polymer eingebunden wird. Die Proteine an der Oberfläche enthalten NH_2 -Gruppen und OH -Gruppen, welche mit dem Isocyanat reagieren können (solange das Polymer noch nicht fertig polymerisiert ist). Besonders NH_2 werden gut eingebunden, da das Isocyanat viel schneller mit NH_2 -Gruppen reagiert als mit OH -Gruppen.

Zur besseren Reproduzierbarkeit des Polymers nimmt man Proben während der Vorpolymerisation bei 70°C und misst davon IR-Spektren (ATR). Dadurch kann die Abnahme der Intensität der Isocyanatbande bei 2263 cm^{-1} mit fortschreitendem Polymerisationsgrad verfolgt werden.

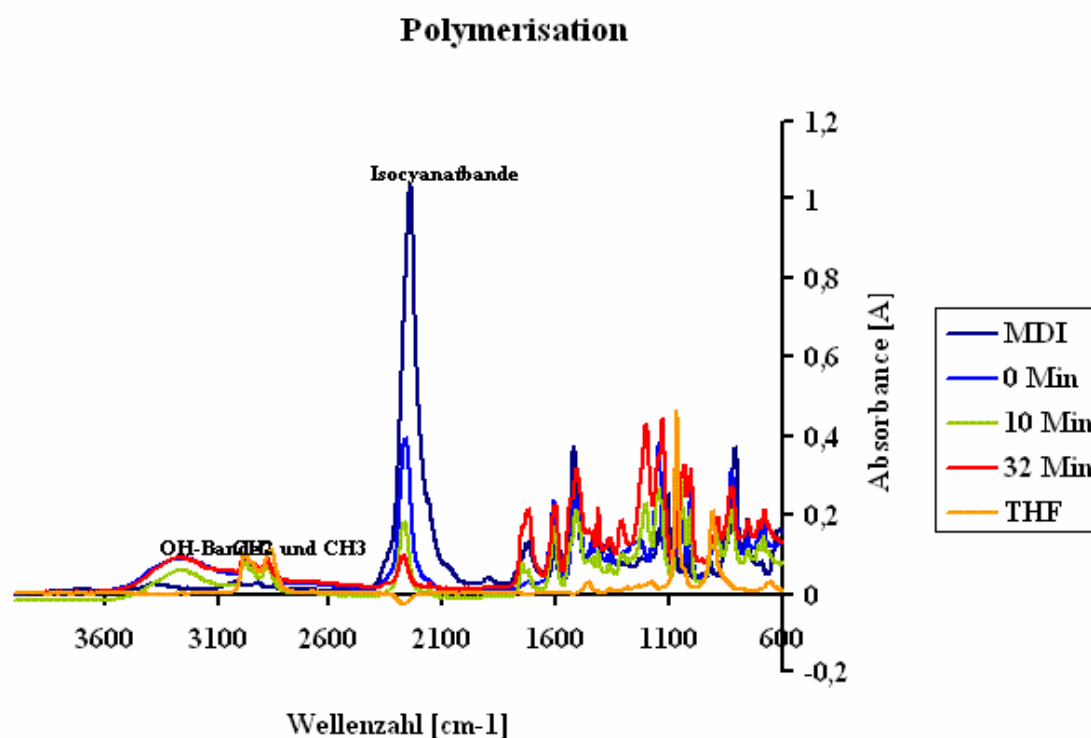


Abb. 115: IR-Spektren (gemessen mittels ATR auf einer Diamantzelle) der Monomerkomponente (MDI), von THF und Prepolymerisat zu verschiedenen Vorpolymerisierungszeiten

Die Identität der Isocyanatbande wurde durch Messung des reinen Isocyanats (MDI) bestätigt. Außerdem wurde auch ein Lösungsmittelspektrum aufgenommen.

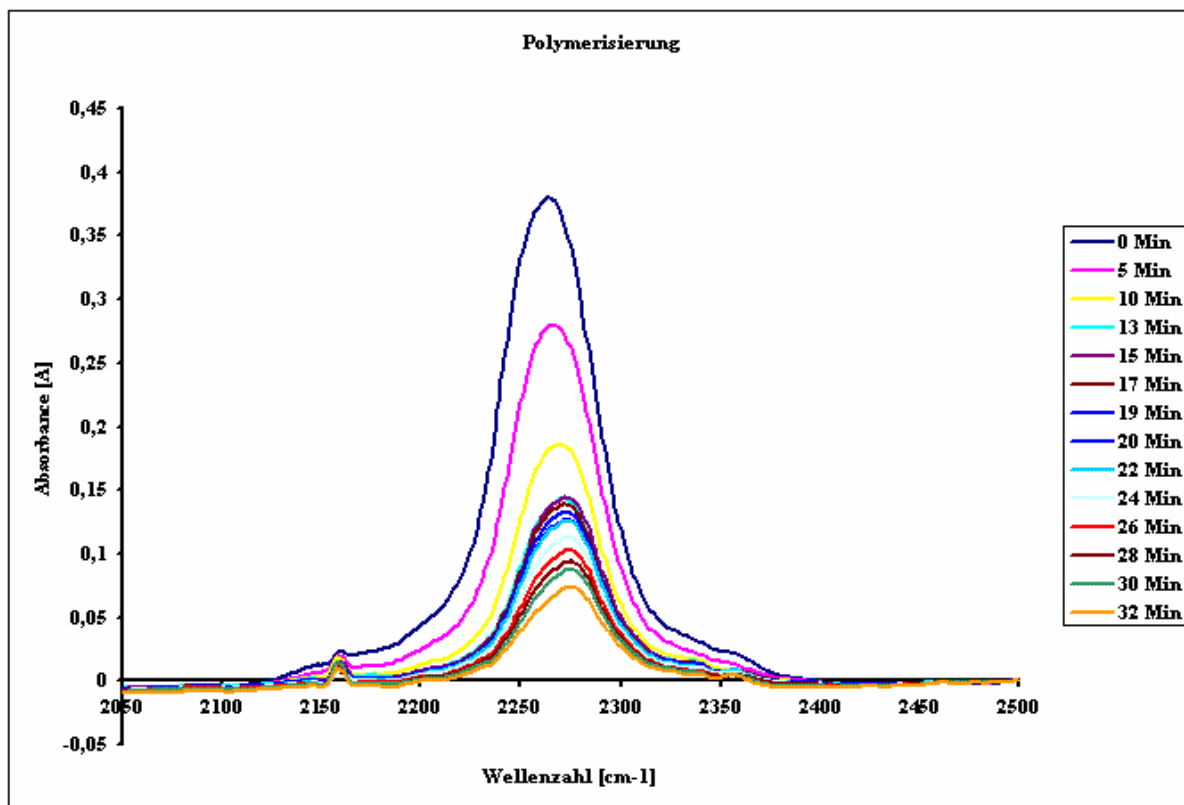


Abb. 116: IR-Bande bei 2263 cm-1 bei verschiedenen Zeiten beim Vorpolymerisieren. Die Isocyanatbande nimmt mit der Zeit ab. Daraus lässt sich der Gelpunkt bestimmen.

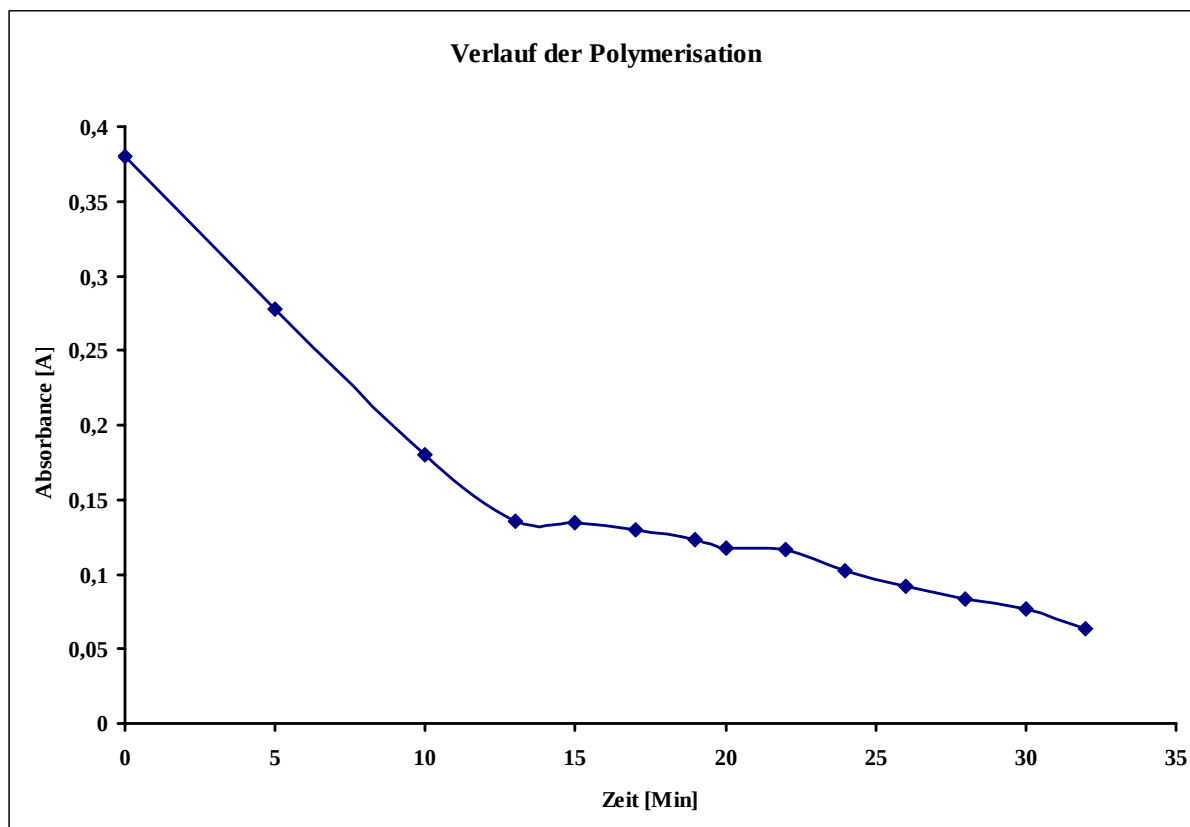


Abb. 117: Bestimmung des Gelpunktes durch Auftragen der Absorption gegen die Zeit. Den Gelpunkt erkennt man am Knick der Kurve

Die Absorbance bei 2263 cm^{-1} wird gegen die Zeit aufgetragen. Man sieht, dass die Absorption und damit die Konzentration des freien Isocyanats zuerst steil abnimmt und die Reaktion dann langsamer wird. Genau am Knick, also bei etwa 13 Minuten befindet sich der Gelpunkt.

Das Prepolymerisat wird für die Prägung verwendet. Dazu drückt man einen Glasstempel mit den Viren ins Polymer und lässt über Nacht aushärten. Dann kann der Stempel abgelöst und die Viren aus dem Polymer gewaschen werden. Den Erfolg der Prägung überprüft man mittels AFM (Abb. 118).

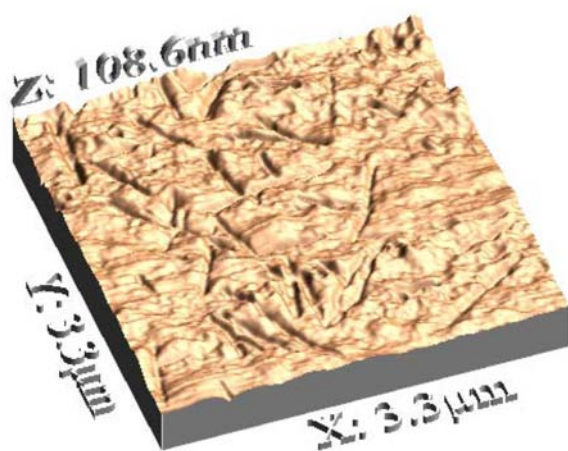


Abb. 118: AFM-Bild der mit TMV geprägten Schicht

Mit den erhaltenen Quarzen wurden QMB-Messungen durchgeführt. Dazu spannt man den Quarz ein und injiziert Puffer und in dem gleichen Puffer gelöste Viren.

Stammlösungen	Molekulargewicht [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	Einwaage [g]
1M Na_2HPO_4	177,99	8,9
1M KH_2PO_4	136,09	6,8
100mM K_2HPO_4	228,32	2,3

Tabelle 10: Puffer in dem die Viren gelöst sind

Ob neben der geometrischen Information, deren Übertragung auf das Polymer mittels AFM verifiziert werden konnte, auch eine chemische Information übertragen wurde, wird mit Schwingquarzmessungen überprüft.

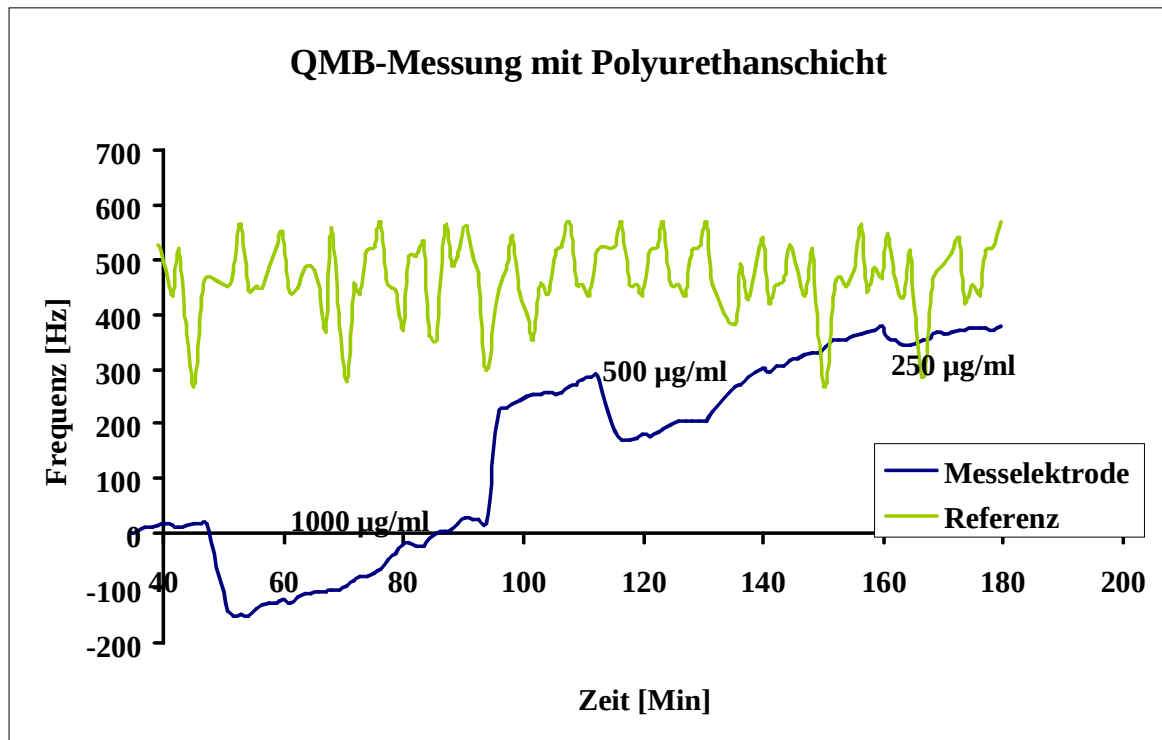


Abb. 119: QMB-Messung eines TMV-Sensors auf Polyurethanbasis: Es wurden abwechselnd Puffer und TMV im gleichen Puffer in verschiedenen Konzentrationen injiziert

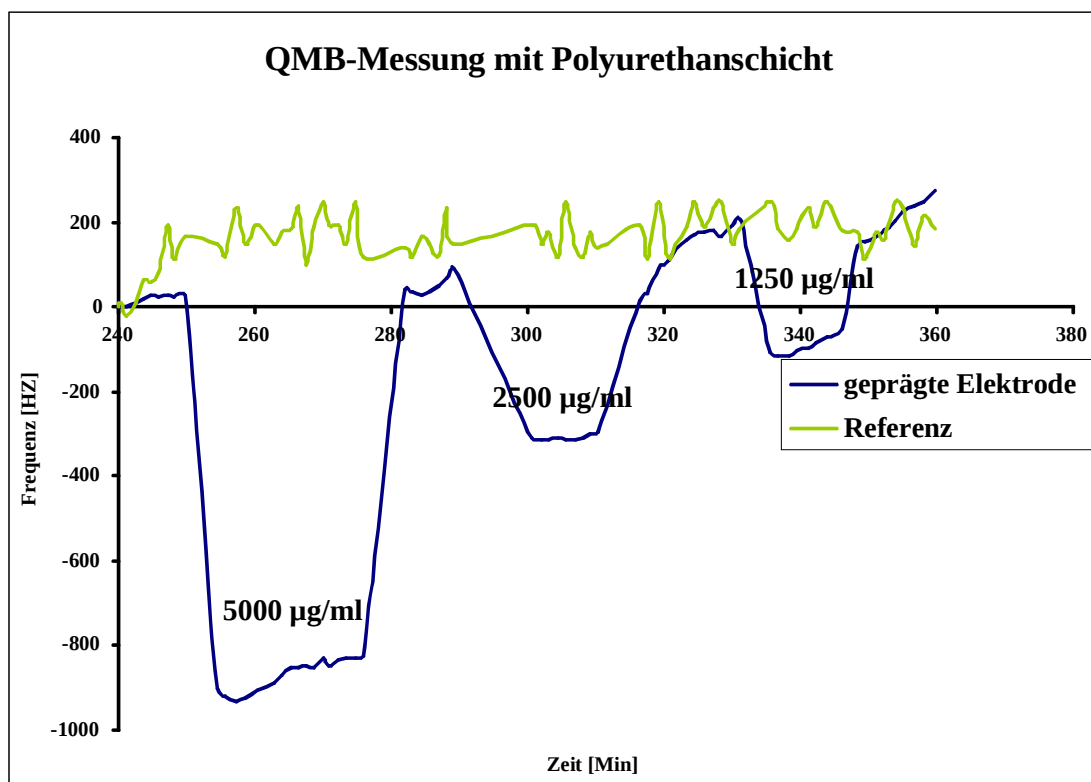


Abb. 120: QMB-Messung eines TMV-Sensors auf Polyurethanbasis: Es wurden abwechselnd Puffer und TMV im gleichen Puffer in verschiedenen Konzentrationen injiziert

Konzentration [µg/ml]	Frequenz [Hz]
5000	922
2500	385
1250	276
1000	175
500	120
250	35

Tabelle 11: Abhängigkeit der Frequenzänderung des Sensors von der Konzentration

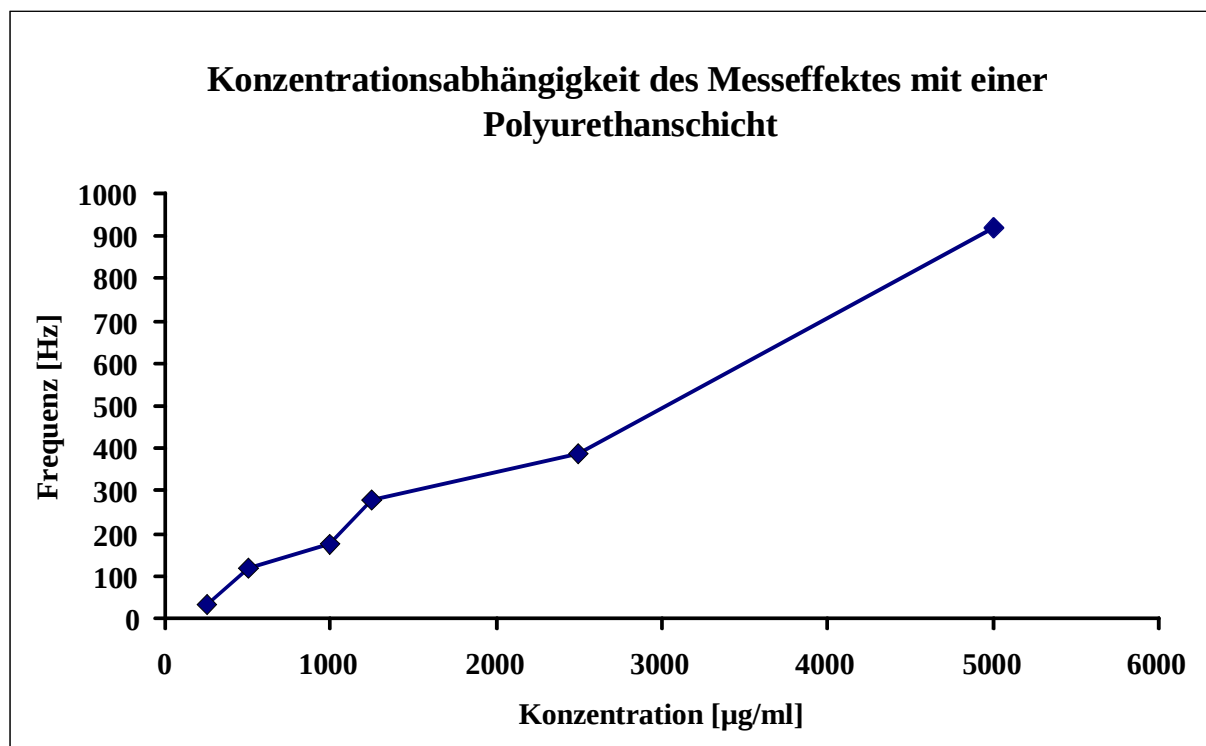


Abb. 121: Abhängigkeit der Frequenzänderung des Sensors mit Polyurethanschicht von der Konzentration von TMV

Es konnte gezeigt werden, dass der Messeffekt von der Konzentration abhängt. Man erhält einen linearen Zusammenhang.

Überprüfung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Man beobachtet schließlich die Wiedereinlagerung der Viren unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dabei vergleicht man die Helligkeit der Bilder der Wiedereinlagerung der markierten Viren mit dem Messeffekt der QMB-Messungen. Die Viren werden (10 µg/ml-Lösung in 100 mMol $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer) im Verhältnis 1:1 mit einer ethanolischen Lösung von Dansylchlorid (1,5 mg/ml) gemischt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Davon tropft man 5 µl auf die Elektrode

und lässt 30min stehen. Dann wird bei 3000rpm abgespinn und unter dem Fluoreszenzmikroskop gemessen.

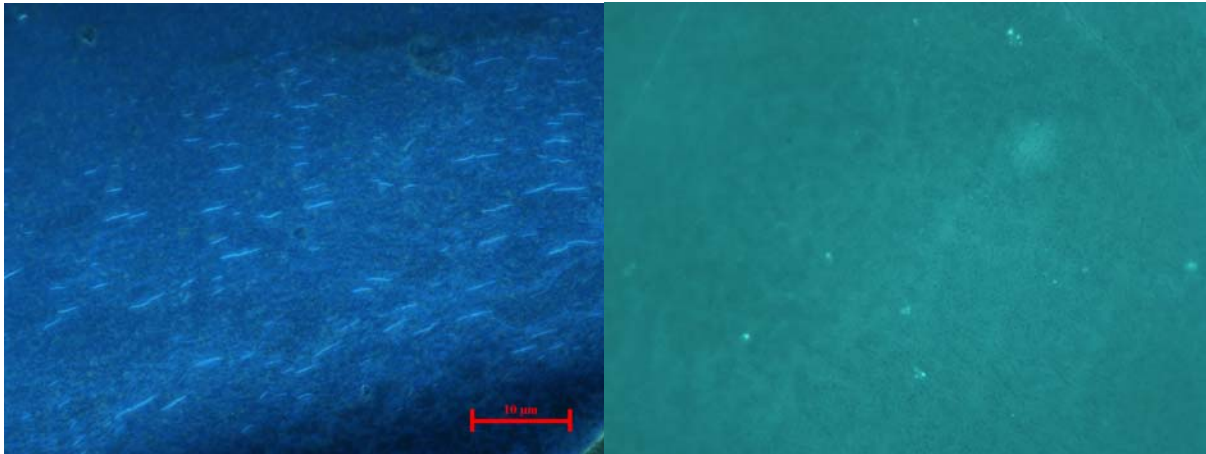


Abb. 122: Wiedereinlagerung von fluoreszenzmarkierten Viren in eine geprägte Polyurethanschicht (links) und die ungeprägte Referenz (rechts) (die Massstabsmarke entspricht einer Länge von 10 µm)

Das Bild ist mit Auto Exposure aufgenommen, es wird also die Belichtungszeit automatisch geregelt und ein dunkles Bild länger belichtet als ein helles. Um Helligkeiten tatsächlich vergleichen zu können, muss man die Belichtungszeit manuell und vor allem für alle Proben gleich einstellen. Es wurde für den Vergleich der Helligkeiten also eine einheitliche Belichtungszeit gewählt (800 ms). Bei dieser Belichtungszeit sind zwar manche Bilder überbelichtet und andere unterbelichtet. Sie wurde deshalb gewählt, weil sie etwa in der Mitte liegt. Die markierten Viren wurden aufgebracht, 30 min stehen gelassen und abgespinn. Dann wurde die Probe kurz mit Wasser abgespült und mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

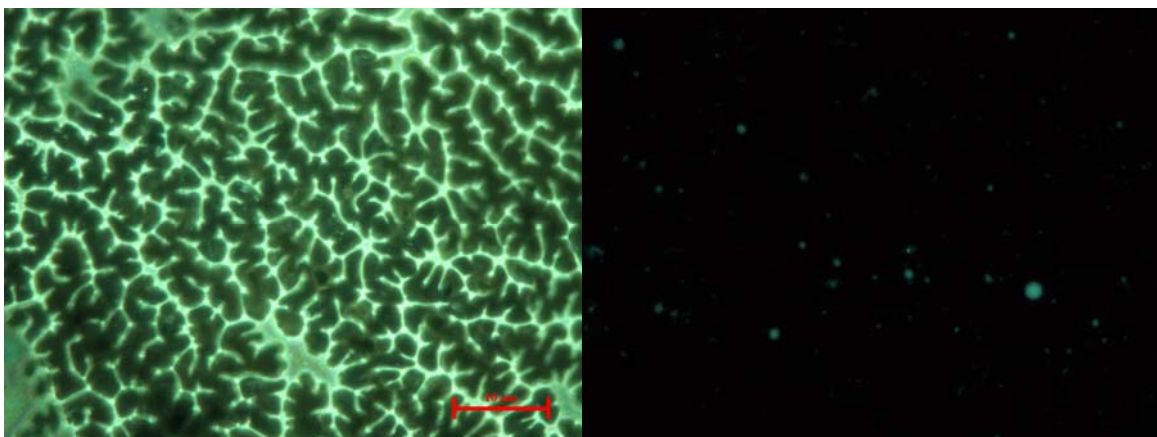


Abb. 123: Geprägte und ungeprägte Elektrode mit markierten TMV bei gleicher Belichtungszeit. Die Markierung entspricht 10 µm

Das linke Bild zeigt die geprägte Elektrode bei 800 ms Belichtungszeit. Das rechte zeigt die ungeprägte Elektrode zum Vergleich bei gleicher Belichtungszeit. Das Gerät verfügt über eine Software mit der man die Helligkeit des jeweiligen Bildes bestimmen, und somit quantifizieren kann.

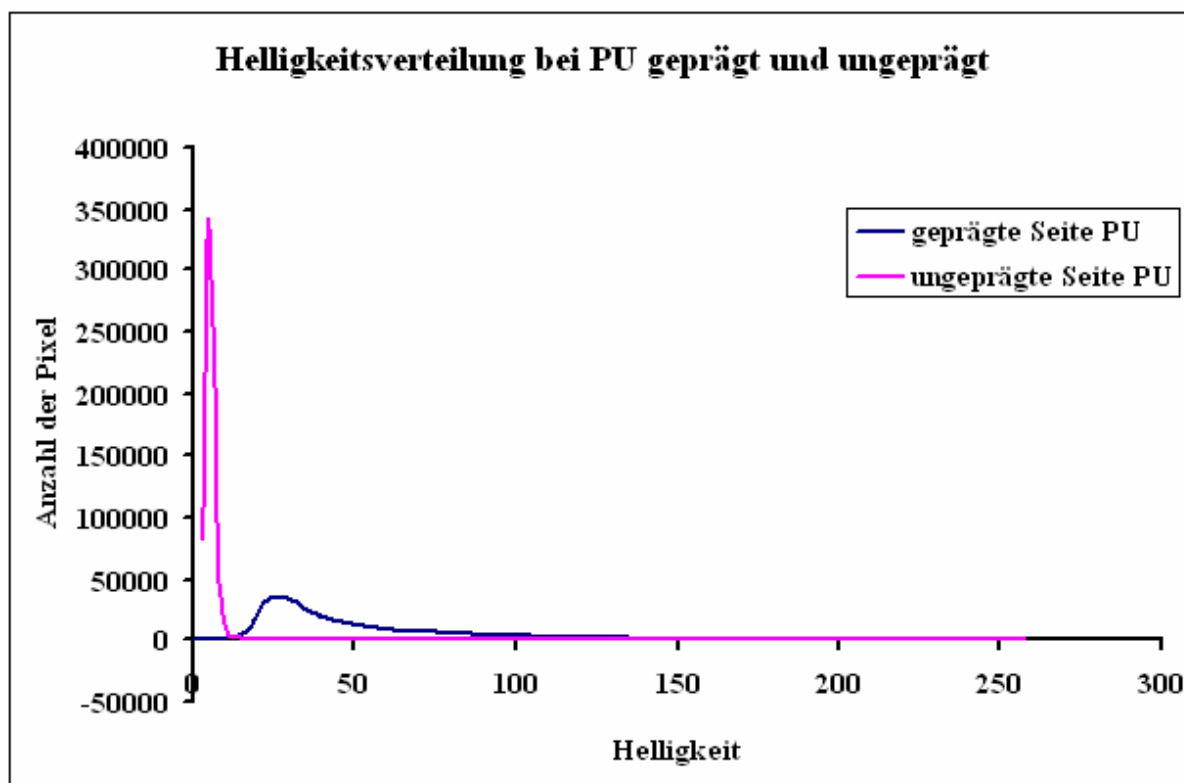


Abb. 124: Verteilung der Helligkeit der geprägten und der ungeprägten Elektrode mit markierten TMV

Das Maximum liegt bei der geprägten Seite bei 25 bei der ungeprägten bei 5. Damit kann die Helligkeit der Bilder besser quantifiziert und ausgewertet werden.

Prägung mit Vinylpyrrolidon

Zum Vergleich wurde für die Prägung auch ein Polyvinylpyrrolidon verwendet.

	Polymer
Vinylpyrrolidon	95 mg
N,N-Methylenbisacrylamid	5 mg
AIBN	1 mg

Tabelle 12: Zusammensetzung des Polymers für die Prägung mit TMV

Dabei wurde auf die Vorpolymerisation verzichtet, da das Polymer sehr schnell fertig polymerisiert, und es praktisch keinen Gelpunkt gibt. Zudem konnte ohne weiteres Lösungsmittel gearbeitet werden, da Vinylpyrrolidon flüssig ist und die anderen Komponenten löst. Nachdem der Quervernetzer (N,N-Methylenbisacrylamid) und der Radikalstarter (AIBN) im Ultraschallbad gelöst worden sind, wird das Polymer direkt für die Prägung verwendet. Man spinnt dabei das Polymer (5 μl) auf und tropft die 1:10 verdünnte Virenlösung (Konzentration: 1000 $\mu\text{g/ml}$) direkt auf. Das Polymer wird einige Minuten unter die UV-Lampe gelegt um die Polymerisation zu starten und über Nacht aushärten gelassen. Der Erfolg der Prägung kann mittels AFM dokumentiert werden.

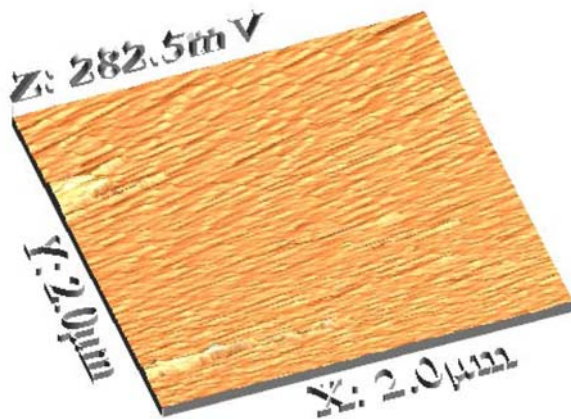


Abb. 125: AFM-Messung der mit TMV geprägten Schicht

Die so hergestellten Quarze werden in die Messzelle integriert und es wird gemessen, ob sie die Viren wieder einlagern.

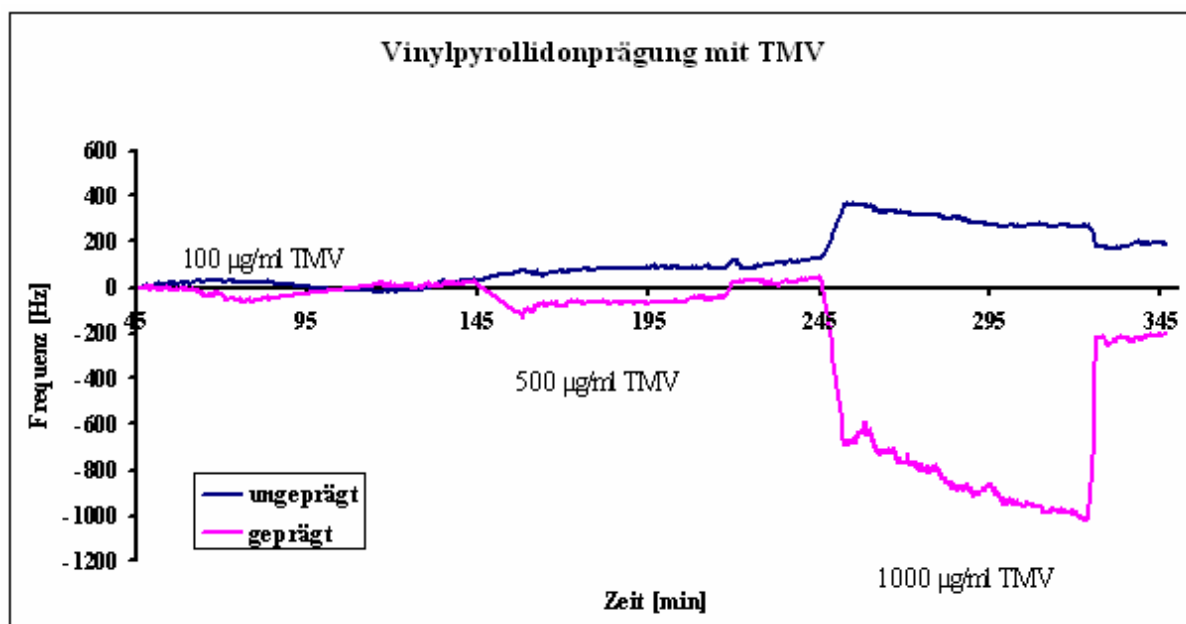


Abb. 126: QMB-Messung einer mit TMV geprägten Schicht bestehend aus Polyvinylpyrrolidon (vernetzt mit N-N-Methylenbisacrylamid): zuerst wurde Puffer injiziert, dann 100 µg/ml TMV, wieder Wasser, dann 500 µg/ml TMV, wieder Wasser, 1000 µg/ml TMV und wieder Wasser. Dabei nimmt bei Zugabe des Virus die Frequenz ab, bei Zugabe von Wasser nimmt sie wieder zu.

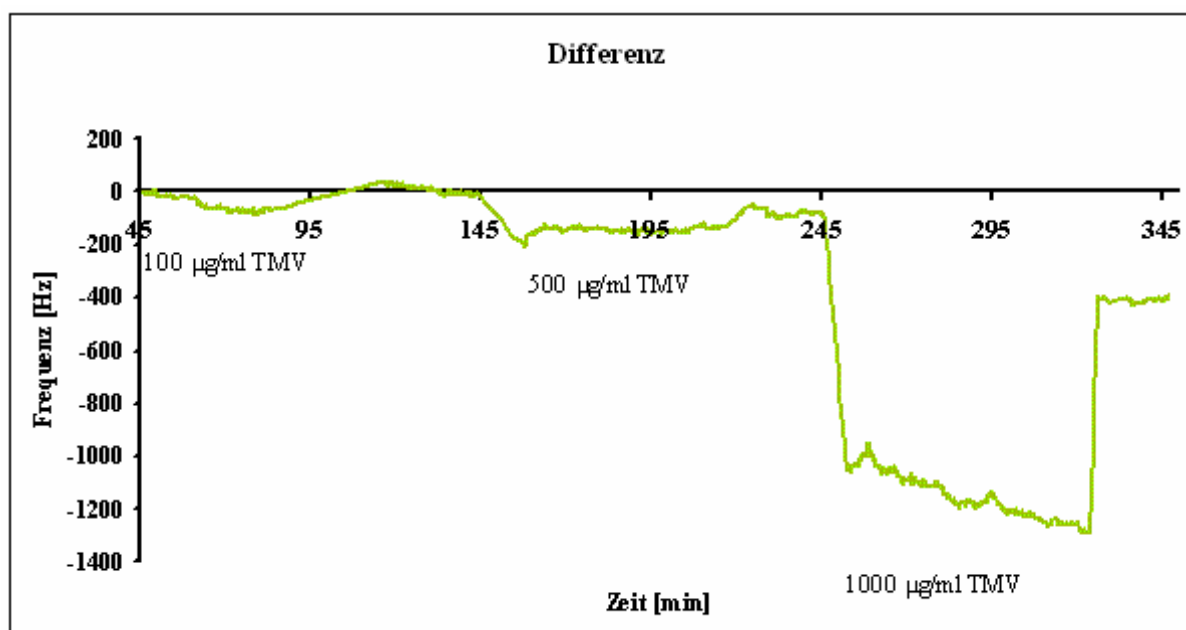


Abb. 127: Differenzmessung (geprägte Elektrode minus Referenz) der in Abb. 126 dargestellten Messkurve

Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	gep. Effekt [Hz]	ungep. Effekt [Hz]	Differenz
100	-54	21	-87
500	-60	85	-149
1000	-1000	272	-1270

Tabelle 13: Messeffekte mit TMV auf einer Polyvinylpyrrolidonschicht

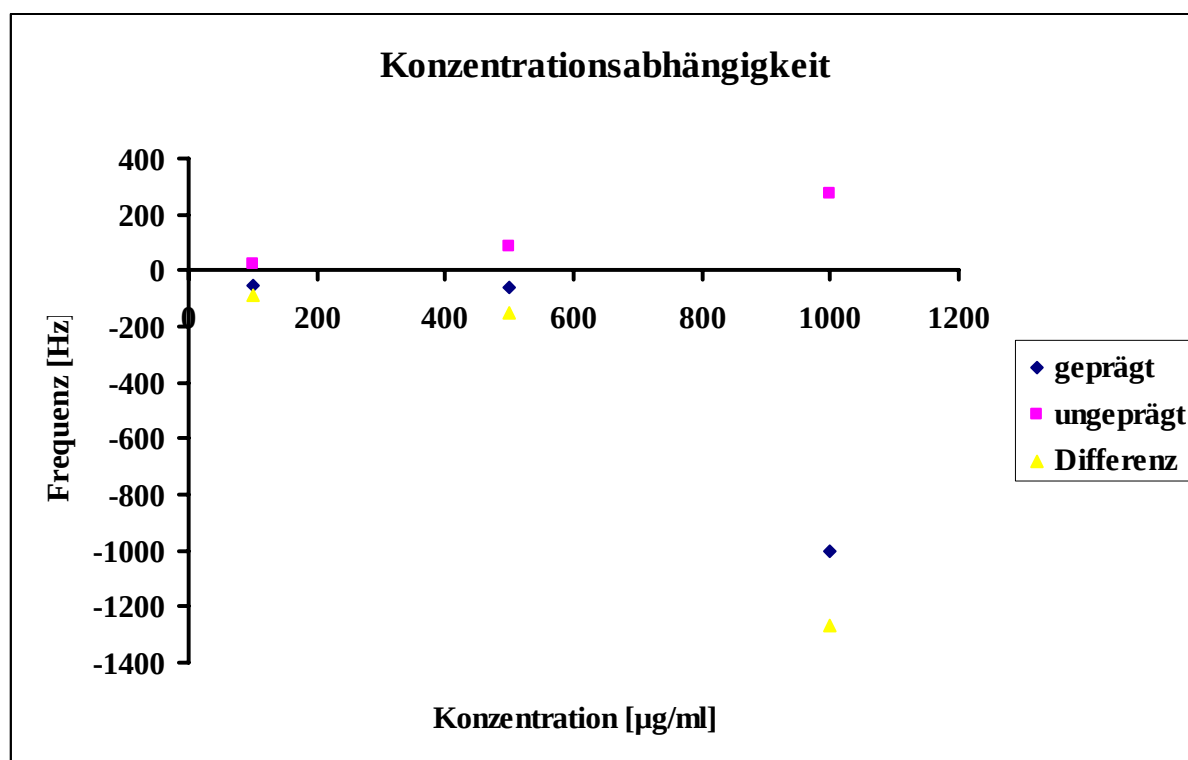


Abb. 128: Konzentrationsabhängigkeit des Messeffektes der QMB-Messung in Abb. 126

Die Messung ergab eine konzentrationsabhängige Frequenzänderung. Die gemessenen Effekte sind größer als die mit Polyurethan (siehe oben). Auf der Referenzelektrode wurde ein positiver Effekt, also eine Zunahme der Frequenz, gemessen. Solche Effekte beobachtet man dann, wenn sich ein Analyt zwar anlagert, aber nur schwach an die Schicht gebunden wird und nicht mitschwingt. Den gleichen Effekt misst man auch auf geprägten Schichten, in denen die Analyten nicht vollständig entfernt werden konnten, oder wie hier auf glatten ungeprägten Schichten.

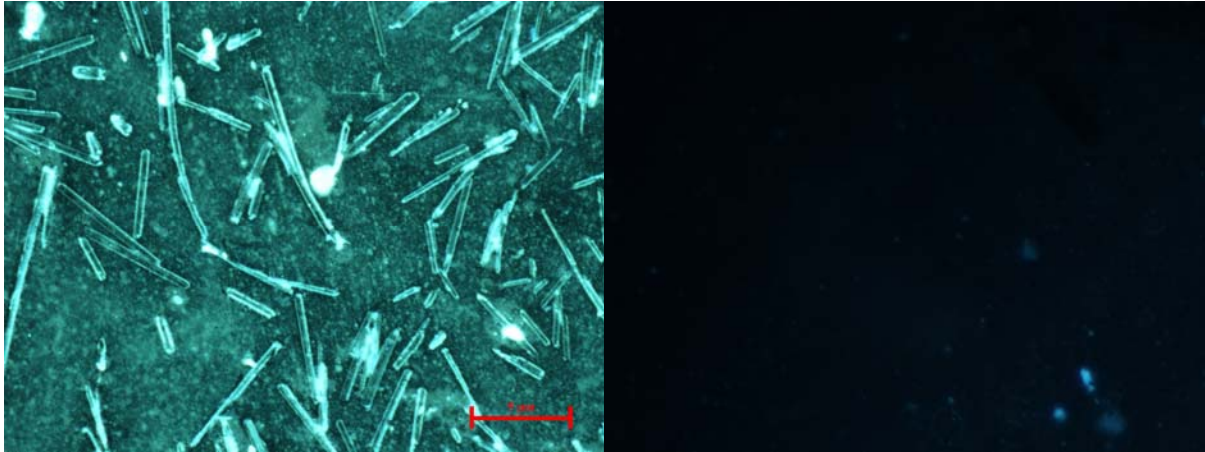


Abb. 129: Geprägte (links) und ungeprägte Schicht (rechts) nach Einlagerung fluoreszenzmarkierter TMV die Markierung im linken Bild entspricht 5 µm im rechten 10 µm

Das Fluoreszenzmikroskopbild in Abb. 129 zeigt Strukturen, die einige µm groß sind. Es kann sich also nicht um einzelne TMV handeln. Es handelt sich um mehrere aneinander gelagerte TMV. Zum Vergleich wurde ein Bild aufgenommen, bei dem eine weniger konzentrierte Lösung für die Wiedereinlagerung verwendet wurde.

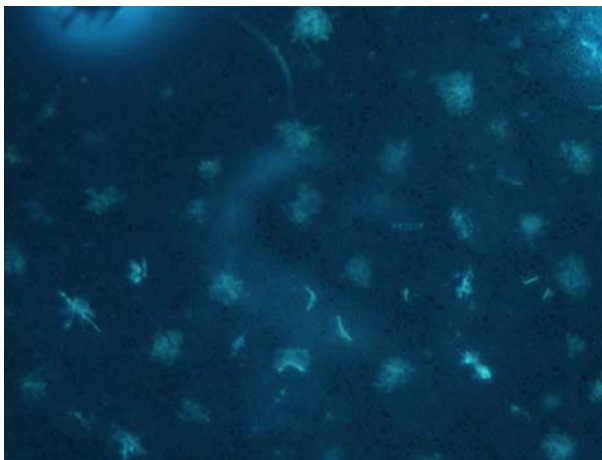


Abb. 130: Aufnahme des Fluoreszenzmikroskops der Wiedereinlagerung einer 1:100 (100 µg/ml) verdünnten TMV-Lösung

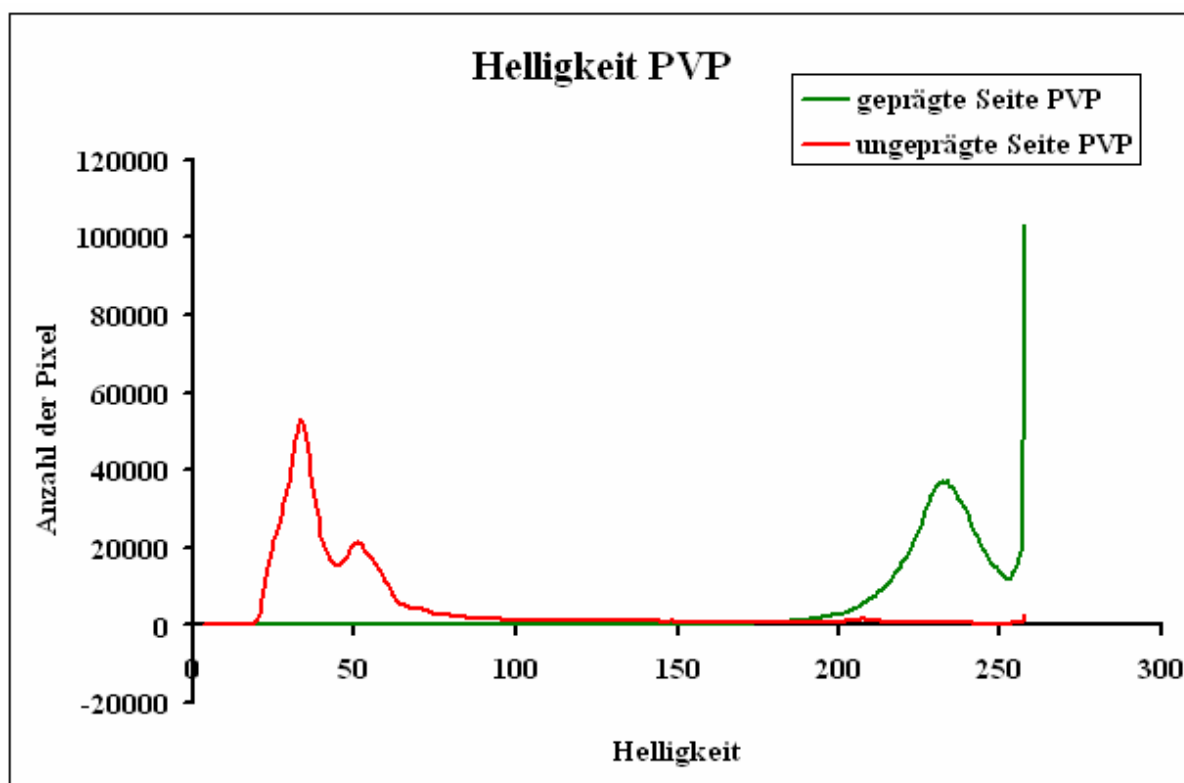


Abb. 131: Helligkeitsverteilung der Fluoreszenzbilder der geprägten und der ungeprägten Elektrode mit Polyvinylpyrrolidon

Daraus ersieht man einen deutlichen Unterschied zwischen der Helligkeit auf der geprägten und der ungeprägten Elektrode. Außerdem ist das Bild der geprägten Elektrode deutlich heller als bei Polyurethan (Vergleich siehe Abb. 145).

Prägung auf Polyacrylat

Polymethacrylat:	Polymer 1
DHEBA	30 mg
Methacrylsäure	50 mg
Vinylpyrrolidon	20 mg
AIBN	1,5 mg

Tabelle 14: Zusammensetzung des verwendeten Polymers zur Prägung (Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer)

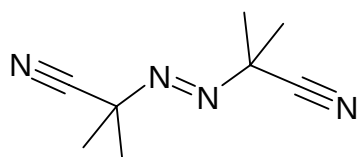
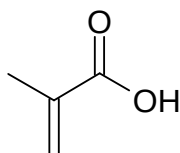
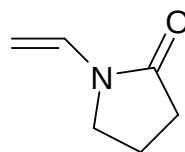
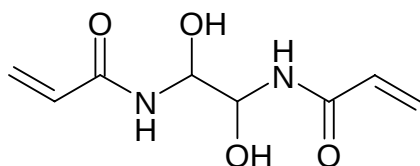
**Azobisisobutyronitril****Methacrylsäure****Vinylpyrrolidon****DHEBA**

Abb. 132: Verwendete Komponenten für die Prägung

Beim Prägen mit Polyacrylat löst man die Polymerkomponenten in 800 µl Wasser und polymerisiert bei 70 °C bis zum Gelpunkt vor. Ist der Gelpunkt erreicht, wird das Polymer 1:2 mit Wasser verdünnt und für die Prägung verwendet. Für die Prägung verwendet man Stempel. Diese werden hergestellt, indem man Virenlösung auf ein Glasplättchen aufträgt und im Kühlschrank assemblieren lässt. Die überstehende Lösung wird abgespinnt, um die Entstehung von Pufferkristallen auf dem Stempel zu verhindern. Etwa 5 µl des Prepolymerisats werden auf dem Quarz verteilt und es wird kurz bei 3000 rpm abgespinnt. Anschließend wird der Stempel hineingedrückt, mit einer Klammer fixiert und über Nacht im Kühlschrank aushärten gelassen. Am nächsten Tag nimmt man den Stempel ab und wäscht den Quarz mit Wasser. Der Erfolg der Prägung wurde mittels AFM überprüft. (Wenn die Viren noch im Polymer verblieben sind, kann man auch sehr kurz mit SDS spülen. Reste von SDS werden mit Wasser abgewaschen.)

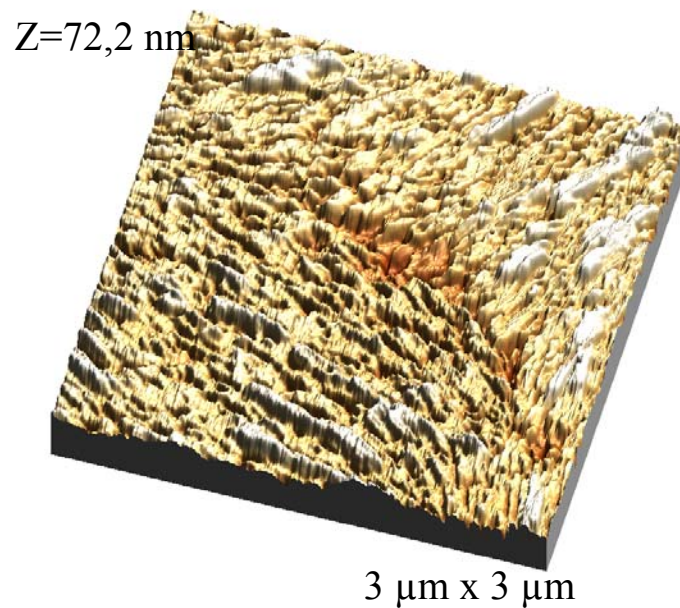


Abb. 133: AFM-Bild der mit TMV geprägten Schichten aus Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer

Man erkennt auf dem AFM-Bild, dass die Prägung erfolgreich war, da die Schicht stäbchenförmige Abdrücke der Viren besitzt. Die so hergestellten Quarze werden für die QMB-Messung verwendet und die Wiedereinlagerung der Viren verfolgt.

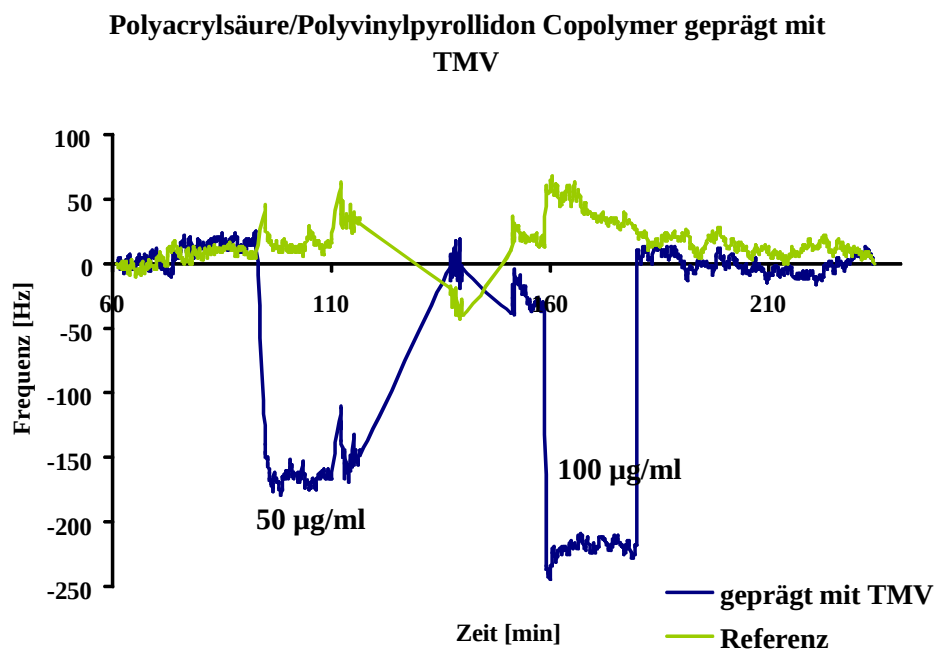


Abb. 134: QMB-Messung mit einem Polyvinylpyrrolidon/Polyacrylat-Copolymer geprägt mit TMV zum Messen von TMV: Es wurden abwechselnd Virenlösung in Puffer und reiner Puffer gemessen

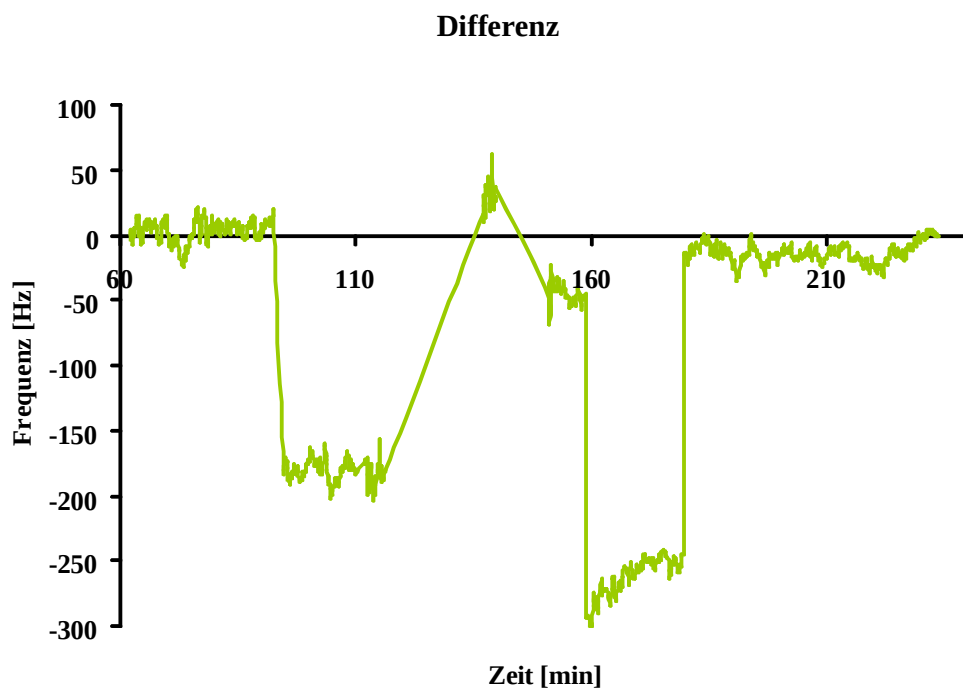


Abb. 135: Differenzmessung (Messelektrode minus Referenz geprägt mit TMV) der Messkurve in Abb. 134

Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Effekt gep	Effekt ungep	Differenz
10	-20	10	-30
50	-175	15	-190
100	-220	30	-250

Tabelle 15: Frequenzänderungen bei der Schwingquarzmessung mit verschiedenen Konzentrationen von TMV

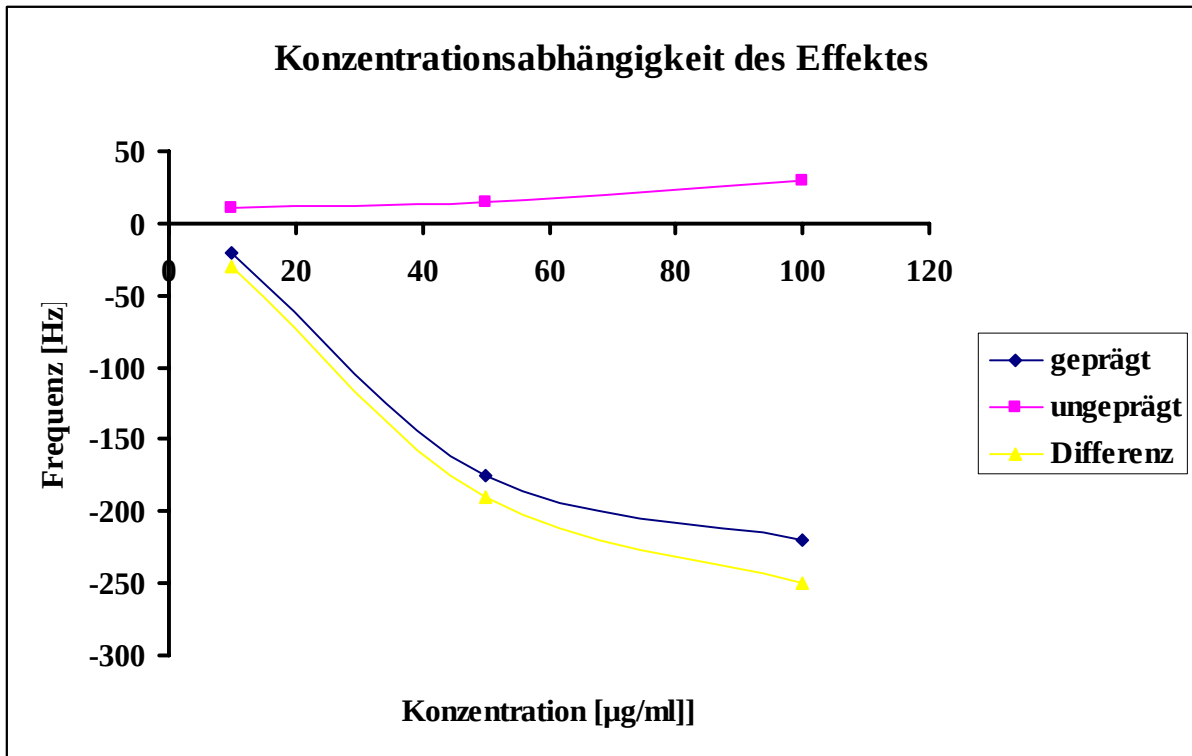


Abb. 136: Abhängigkeit des Messeffektes bei der QMB-Messung mit TMV

Man beobachtet einen Messeffekt, der von der Konzentration abhängig ist. Wegen der größeren Effekte, die gemessen wurden, war eine Messung bei geringeren Konzentrationen möglich. Auch bei den TMV-Sensoren mit Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer für die sensitive Schicht wurde die Güte überprüft durch Messung der Wiedereinlagerung von TMV.

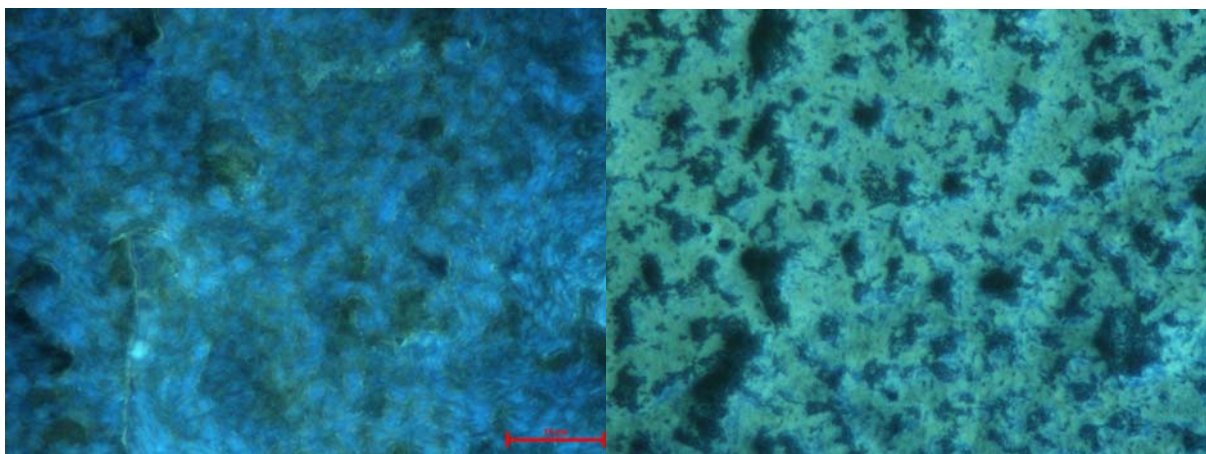


Abb. 137: Fluoreszenzmikroskopie: Das rechte Bild zeigt die geprägte Elektrode, das linke zeigt die ungeprägte Seite (der Messbalken entspricht 10 µm)

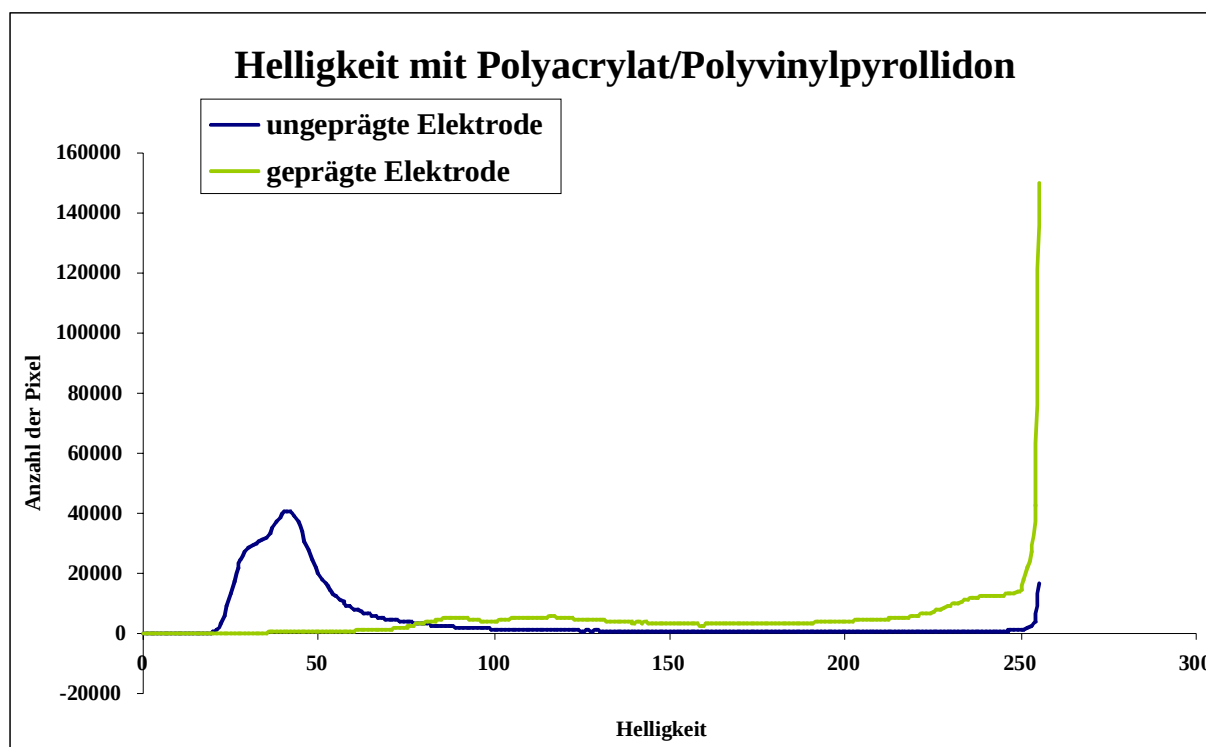


Abb. 138: Helligkeitsverteilung der Pixel bei den mit Polyacrylat/Polyvinylpyrrolidon geprägten Quarzen, dabei steht 0 für schwarz und 255 für ganz weiß

Da bei der Prägung mit Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon die größten Effekte gemessen werden konnten, wurde die ursprüngliche Zusammensetzung noch verändert, um das Polymer zu optimieren. Dazu wurde zuerst der Quervernetzeranteil erhöht. Ein hoher Anteil des Quervernetzers erhöht die Rigidität des Polymers und wirkt der Quellung entgegen. Es muss darauf geachtet werden, dass der Quervernetzeranteil nicht zu groß wird, da sonst der Analyt nicht mehr ausgewaschen werden kann.

Polymethacrylat:	
DHEBA	60 mg
Methacrylsäure	50 mg
Vinylpyrrolidon	20 mg
AIBN	1,5 mg

Tabelle 16: Zusammensetzung des verwendeten Polymers

Die Quarze wurden, wie oben beschrieben, hergestellt und für die QMB-Messung verwendet.

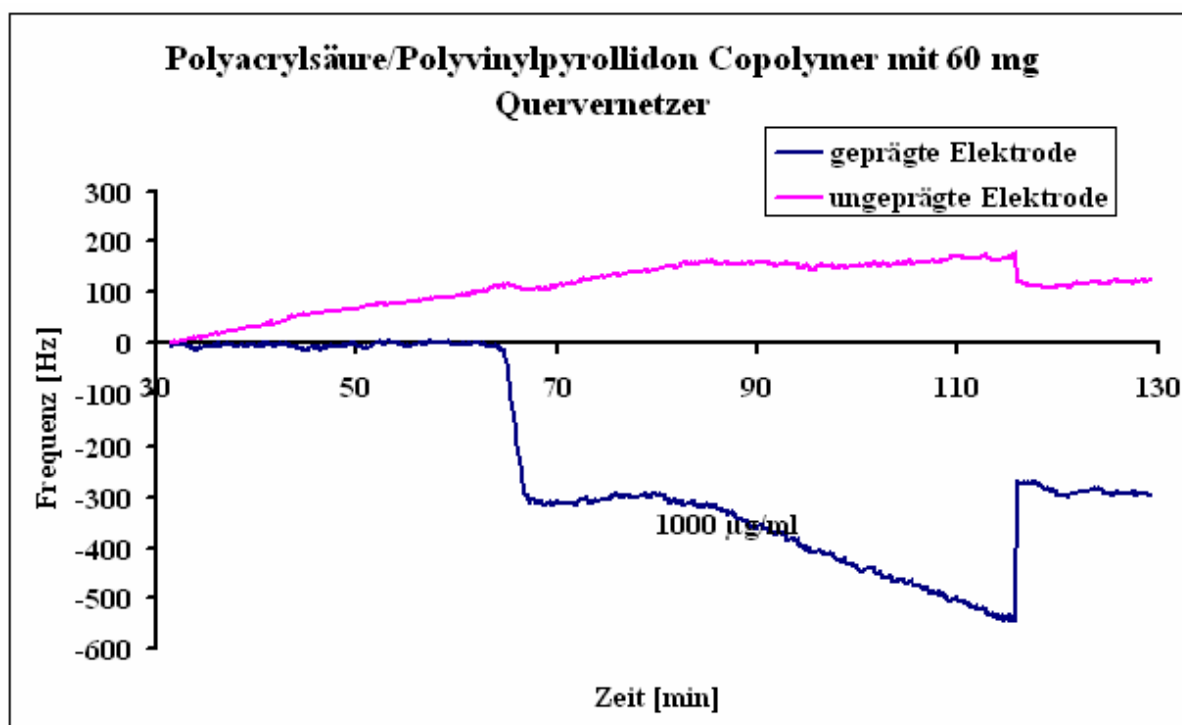


Abb. 139: QMB-Messung mit einem Polymer (Polyacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer) mit höherem Quervernetzeranteil (DHEBA). Es wurden zuerst Puffer, dann Viren und wieder Puffer injiziert

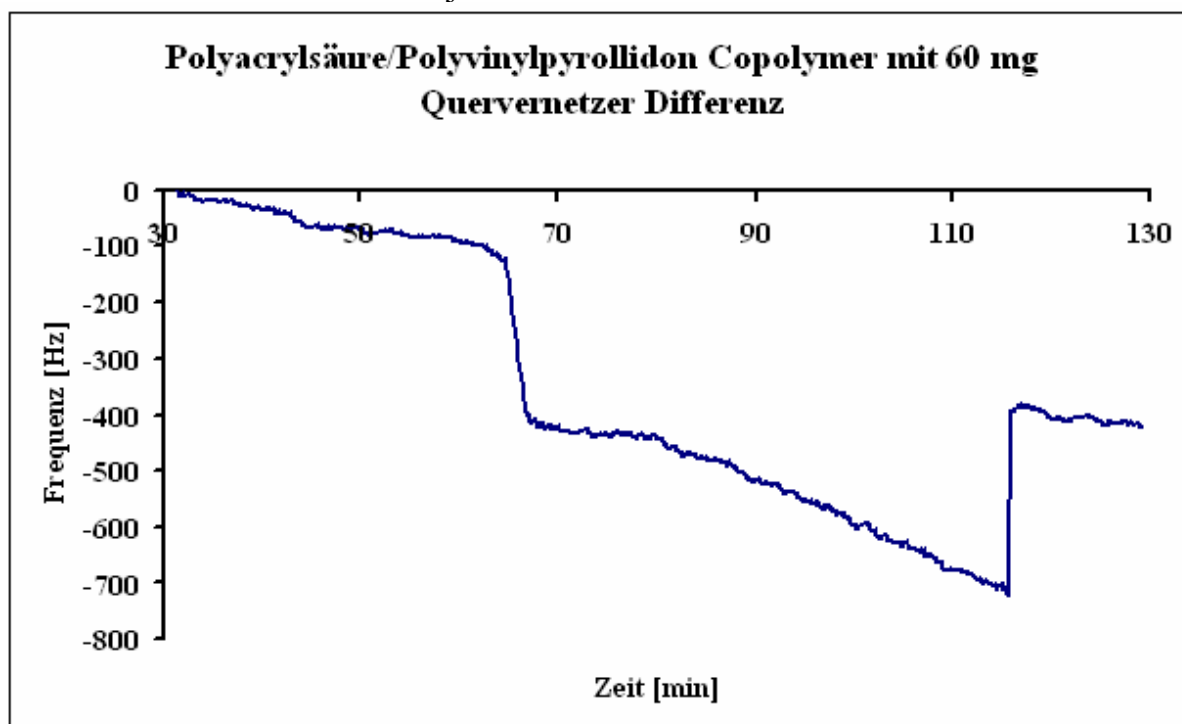


Abb. 140: Differenzmessung (geprägte Elektrode minus Referenz) der Messkurve in Abb. 140

Man erhält dabei deutlich schlechtere Messergebnisse als bei der Messung mit weniger Quervernetzer. Zusätzlich ist der Messeffekt nicht vollständig reversibel. Auch von diesen Quarzen wurden noch Fluoreszenzbilder gemacht.

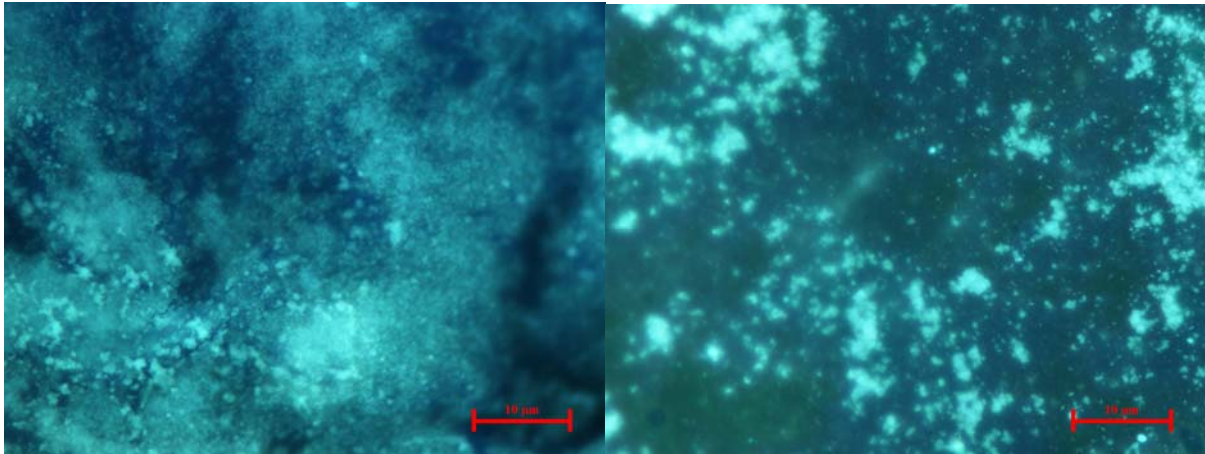


Abb. 141: Quarze mit fluoreszenzmarkierten TMV geprägte (links) und ungeprägte Seite (rechts). Die Massstabsmarken entsprechen einer Länge von 10 µm.

Auch auf den Fluoreszenzbildern ist der Unterschied zwischen geprägten und ungeprägten Elektroden deutlich geringer als bei den vorherigen Versuchen.

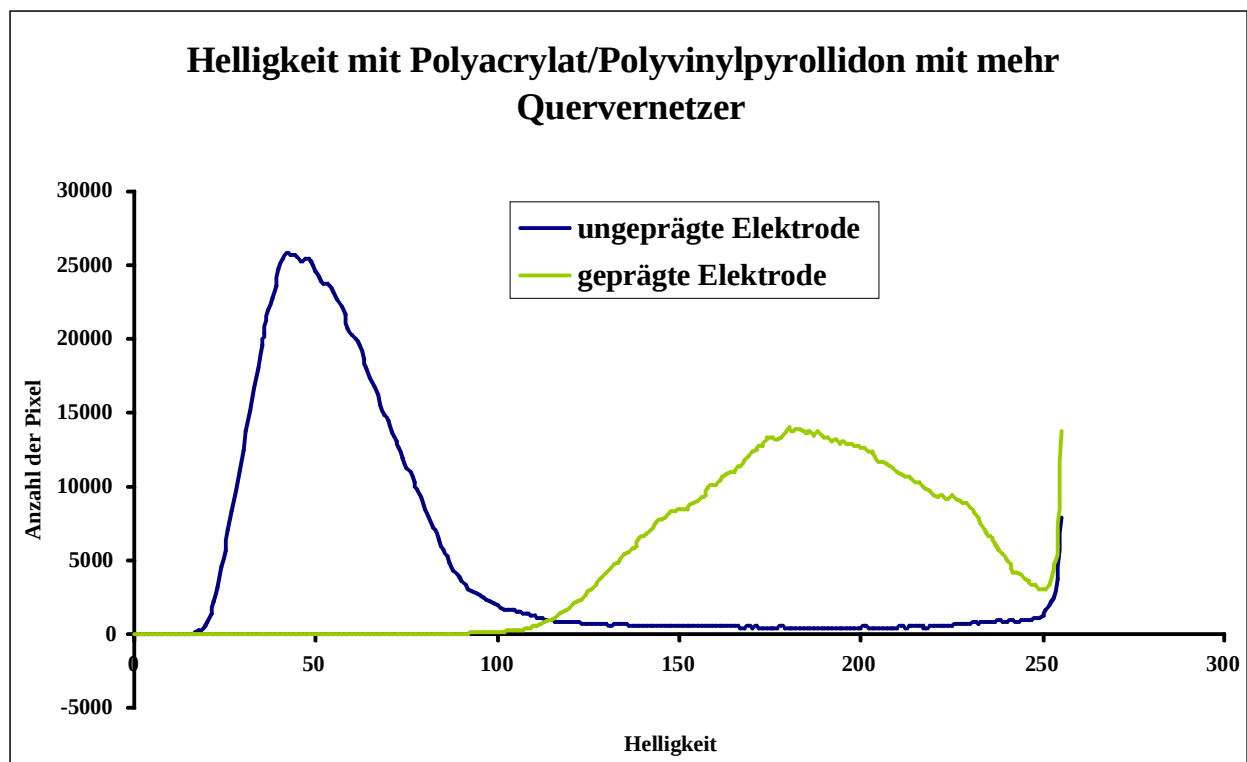


Abb. 142: Helligkeitsverteilung der Pixel bei den mit Polyacrylat/Polyvinylpyrrolidon geprägten Quarzen, dabei steht 0 für schwarz und 255 für ganz weiß

Aus der Abbildung ersieht man, dass die geprägte und die ungeprägte Elektrode ähnlicher sind als bei den anderen Versuchen. Dieses Ergebnis bekommt man auch mit den QMB-Messungen.

Es kann auch mittels Fluoreszenzspektroskopie der Erfolg der Prägung bestätigt werden. Dazu wird die geprägte Schicht auf ein Glasplättchen (etwa 1 x 2 cm) aufgetragen statt auf einen Quarz. Die Polymerschicht wird geprägt und die Viren wieder ausgewaschen (siehe oben). Anschließend soll die wieder Einlagerung von markierten Viren gemessen werden. Zum Markieren wurde eine Lösung von DNSCl in Wasser hergestellt (analog zu ^[1]). Da DNSCl in Wasser unlöslich ist wurde es stattdessen in Ethanol gelöst (1,5 mg/ml). 50 µl dieser Lösung vermischt man mit 50 µl der unverdünnten Virenlösung.

Die so erhaltenen markierten Viren trägt man auf die Glasplättchen auf (30 µl). Man lässt eine halbe Stunde bei Raumtemperatur assemblieren, damit sich die Viren in die Schicht einlagern können, und spinnt die überstehende Lösung ab. Dann nimmt man ein Fluoreszenzspektrum (direkt auf dem Glasplättchen) auf, um festzustellen, ob eine Fluoreszenzmessung möglich ist.

Fluoreszenzmessung der Emission von wiedereingelagerten markierten TMV in eine Schicht

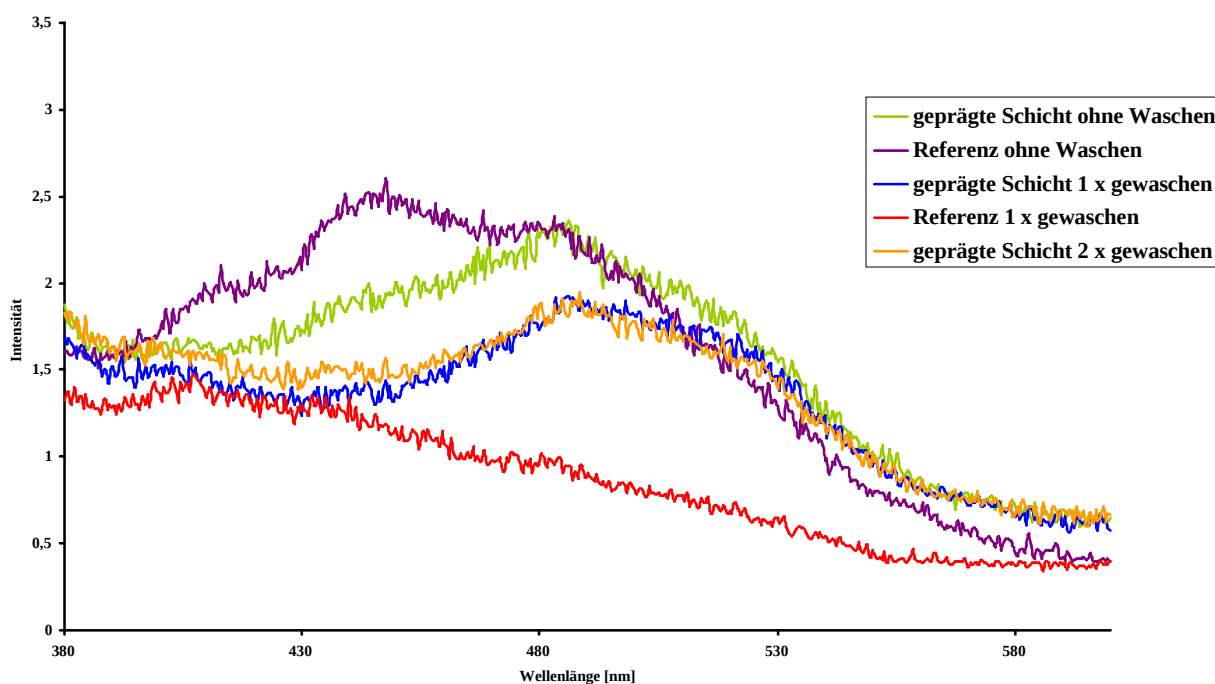


Abb. 143: Fluoreszenzspektroskopiemessung einer Polymerschicht, die mit TMV geprägt wurde, und einem Referenzpolymer, um den Erfolg der Prägung zu zeigen (die Kurven zeigen die Mittelwerte aus 3 Messungen von verschiedenen Glasplättchen). Die Anregung erfolgte bei 350 nm.

Dabei erhält man für das geprägte und das ungeprägte Polymer etwa gleiche Intensitäten. Anschließend wäscht man beide Proben vorsichtig mit Wasser (mit einer Spritzflasche), und misst erneut die Fluoreszenz. Wie aus Abb. 143 ersichtlich, werden die fluoreszenzmarkierten Viren von der geprägten Schicht nicht vollständig abgewaschen, wohingegen die Fluoreszenz bei den ungeprägten Schichten vollständig verschwindet. Es konnte somit das Ergebnis der QMB-Messung nochmals bestätigt werden.

Vergleich und Diskussion

Abschließend sollten die einzelnen Polymersysteme anhand ihrer Güte für die Wiedereinlagerung der TMV verglichen werden. Dazu wurden die Ergebnisse der QMB-Messungen und parallel dazu die Fluoreszenzmikroskopie verwendet.

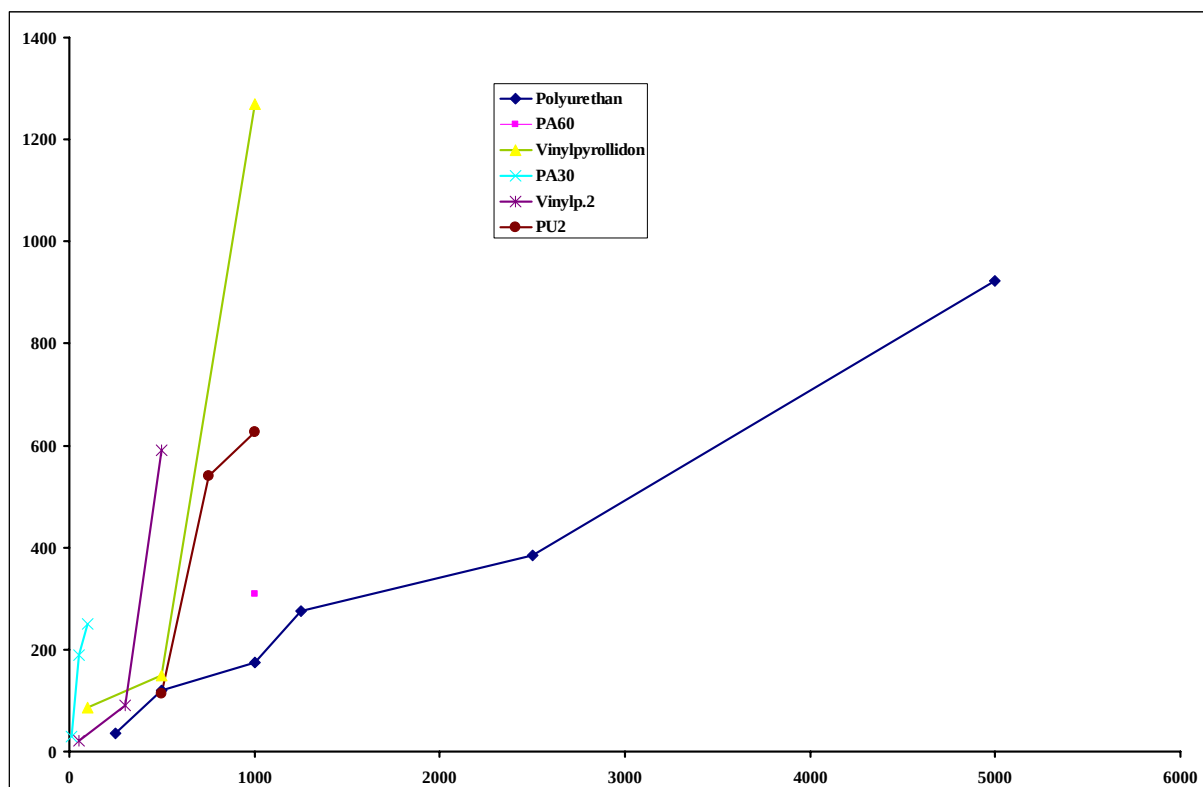


Abb. 144: QMB-Messung: Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der Messeffekte mit verschiedenen Polymeren

Daraus ersieht man, dass die mit Polyvinylpyrrolidon/Polyacrylat geprägten Schichten die besten Messeffekte ergeben (steilster Anstieg der Kurve). Die

Vinylpyrrolidonschichten ergeben die zweitbesten Messergebnisse und Polyurethan die schlechtesten.

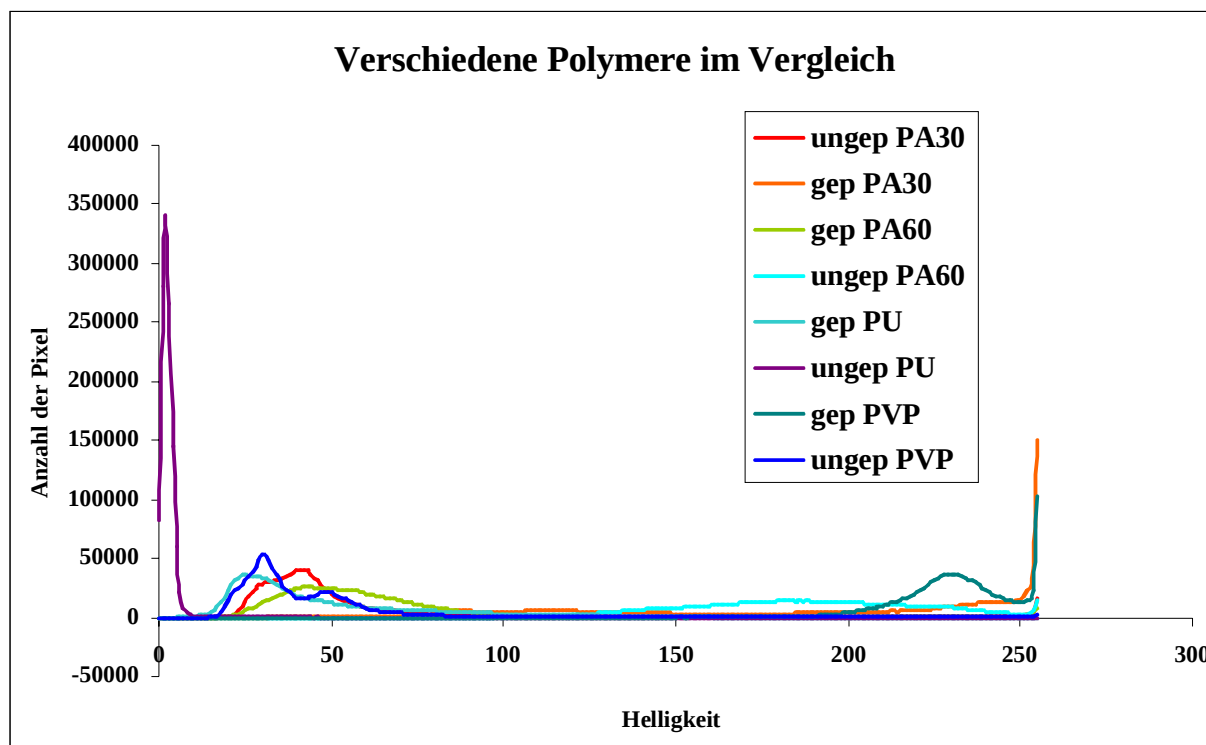


Abb. 145: Vergleich der Helligkeiten bei verschiedenen Polymeren. Dabei bedeutet 0 schwarz und 255 weiß

Die Helligkeiten der Fluoreszenzbilder von verschiedenen Polymeren bei gleicher Belichtungszeit und gleicher zugegebener TMV-Menge wurden verglichen. Wie auch aus der QMB-Messung ergibt sich daraus, dass die wasserlöslichen Polymere mehr TMV wiedereinlagern als Polyurethan. Dies kommt daher, dass das Polyurethan weniger polar ist als Polyacrylat. Ein weiterer Vorteil der wasserlöslichen Polymere ist, dass kein Isocyanat verwendet wird. Man hat also keine Probleme mit der kovalenten Einbindung der Analyte und erspart sich damit die Behandlung mit Modifizierlösungen. Während man beim Prägen mit Polyurethan vor allem bei kleinen Analyten darauf achten muss, dass die Proben trocken sind (Isocyanat reagiert auch mit Wasser und es bilden sich CO_2 -Blasen, die die Oberfläche zerstören können), ist Feuchte bei den wasserlöslichen Polymeren kein Problem. Nachteile der wasserlöslichen Polymere sind die schlechtere Langzeitstabilität wegen des teilweisen Auswaschens des Polymers durch Wasser. Dem kann man durch Behandeln der Quarze mit Thiolen, die über SH-Gruppen an das Gold binden, und über andere Funktionalitäten, die die Oberfläche hydrophiler machen, zum Teil entgegenwirken.

Auch quillt das Polyurethan generell etwas weniger als die wasserlöslichen Polymere. Unter den beiden verwendeten wasserlöslichen Polymeren ist das Polyvinylpyrrolidon/Polyacrylat-Copolymer grundsätzlich robuster als das Polyvinylpyrrolidon, welches dafür einfacher in der Herstellung ist, da man den Schritt des Vorpolymerisierens einspart. Das Arbeiten mit Polyvinylpyrrolidon erfordert eine schnelle Verarbeitung der Monomermischung (bis etwa eine Stunde nach Herstellung verwendbar). Danach wird die Reproduzierbarkeit schlechter, weil es sein kann, dass sich Kristalle bilden, und man keine einheitlichen Schichten mehr erhält. Das Copolymer kann als verdünnte Monomermischung länger (etwa ein Monat) verwendet werden. (Polyurethan ist als verdünnte Monomerlösung etwa zwei Wochen verwendbar, weil es auch in verdünntem Zustand weiter polymerisiert.) Das Copolymer mit mehr Quervernetzer hat sich in allen Versuchen als ungünstiger herausgestellt.

Welches Polymer man verwendet ist also je nach Anwendung abzuwägen.

Zusammenfassung (TMV)

Es sollten verschiedene Polymersysteme auf ihre Eignung als Sensormaterialien für die Messung von Tabakmosaikviren getestet werden. Der Erfolg der Prägung wurde mittels QMB-Messung und Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie und die der QMB-Messung waren vergleichbar. Es wurden ein Polyurethan, Polyvinylpyrrolidon und ein mit DHEBA quervernetztes Polyvinylpyrrolidon/Polymethacrylsäure-Copolymer mit verschiedenen Quervernetzeranteilen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass ein Copolymer, dessen Monomere wasserlöslich sind und das fähig ist, Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden, günstig für die Messung von Biomolekülen ist und die größten Messeffekte liefert. Auch auf den dazugehörigen Bildern über die Einlagerung der fluoreszenzmarkierten Viren waren die Bilder mit dem Copolymer als sensitive Schicht heller. Man kann auf den Bildern Abb. 122, Abb. 129 und Abb. 137 Überstrukturen von zusammen gelagerten Viren erkennen. Die einzelnen Viren sind mit einer Länge von 300 nm und einer Breite von 18 nm zu klein, um aufgelöst werden zu können.

Summary

Natural antibodies as they are used for ELISA are well established molecular recognition materials for e.g. proteins or viruses. They are known for their selectivity and high binding affinities to their antigens caused by a fit of the binding site with the antigen structure. However, the generation of immunoglobulin coatings is accompanied by appreciable time consuming efforts. Additionally, for sensor application natural immunoglobulins require a special treatment to break the bond between antigen and antibodies to make the sensor response reversible. Furthermore, natural materials tend to degrade since proteins include oxidizable groups which lead to denaturation. The problems can be solved when these recognition capabilities of natural antibodies are transferred to organic polymers which are more stable than biological materials. In this way immunological responses and interaction mechanisms to antigens which are established in a long evolution period are cast in polymers. Such polymers in combination with quartz crystal microbalances allow mass sensitive and

label free detection of bioanalytes. Therefore, beads in the size of 20-600 nm are pre-polymerised and precipitated out in presents of natural immunoglobulins. The nanoparticles are washed to remove the antibody leaving wholes with negative structures of the antibody. Finally, these particles are adhered on a glass plate dried and pressed into an other polymer placed on the electrodes of a QMB. After removing the stamp polymer with positive structure of the antibody the replica is left. The resulting sensor shows between 10 and 20 times higher signals to the suitable antigens than natural antibodies. Such antibody replica could be created for rhino viruses, immunoglobulins and sesame proteins. The cross-reactivity is very low or negligible. For different antigens of interest the procedure can easily be adapted by changing the antibody starting material to any with the suitable antigen. In the second part of the work the ability of detecting tobacco mosaic virus of different polymers was tested. The results with 10 MHz QCM were validated by measurement of fluorescence microscopy of adsorbed marked viruses. With both techniques a crosslinked polyvinylpyrrolidone polymethacrylic acid showed the best results

ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME

ACN	Acetonitril
AFM	atomic force microscopy
AIBN	Azobisisobutyronitril
AK	Antikörper
ATR	attenuated total reflection
DHEBA	N,N'-(1,2-Dihydroxyethylen)bisacrylamid
HRV	Human rhino virus
Hz	Hertz
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgY	Immunglobulin Y
IR	Infrarot
KOH	Kaliumhydroxid
λ	Wellenlänge
Lsm	Lösungsmittel
PBS	phosphate buffered saline
MKSV	Maul- und Klauenseuche Virus
PDMS	Polydimethylsiloxan
PU	Polyurethan
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QMB	quartz micro balance, auch QCM (quartz crystal micro balance) genannt
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	rotations per minute
SDS	Sodium dodecylsulfat
SES	Sesam
T	Temperatur in /C
THF	Tetrahydrofuran
TMV	Tabak-Mosaik Virus
UV	Ultraviolett

Literatur

- 1 Peter A. Lieberzeit , A. Afzal, A. Rehman, Franz L. Dickert; **Nanoparticles for detecting pollutants and degradation processes with mass-sensitive sensors**; Sensors and Actuators B 127, 2007

- 2 Peter A. Lieberzeit, Sylwia Gazda-Miarecka, Konstantinos Halikias, Christian Schirk,, Jörg Kauling, Franz L. Dickert; **Imprinting as a versatile platform for sensitive materials – nanopatterning of the polymer bulk and surfaces**; Sensors and Actuators B 111–112, 2005

- 3 Franz L. Dickert, Peter Lieberzeit, Oliver Hayden; **Sensor strategies for microorganism detection – from physical principles to imprinting procedures**; Analytical and Bioanalytical Chemistry 377, 2003

- 4 Zhao Li, Jianfu Ding, Michael Day, Ye Tao, **Molecularly imprinted Polymeric Nanospheres by Diblock Copolymer Self-Assembly**, Macromolecules 39, 2006

- 5 Peter A. Lieberzeit, Adeel Afzal, Gerd Glanzing, Franz L. Dickert; **Molecularly imprinted sol–gel nanoparticles for mass-sensitive engine oil degradation sensing**; Analytical and Bioanalytical Chemistry 389, 2007

- 6 Gianluca Ciaradelli, Cristina Borrelli, Davide Silvestri, Caterina Cristallini, Niccoletta Barbani, Paolo Giusti, **Supported imprinted nanospheres for the selective recognition of cholesterol**, Biosensors and Bioelectronics 21, 2006

- 7 F. L. Dickert, **Sensoren für Gase und Lösungsmitteldämpfe – Ein Beitrag zur Umweltanalytik**, Chemie unserer Zeit 3 1992

- 8 E. M. Logothetis, **Automotive Oxygen Sensors**, Chemical Sensor Technology, Vol. 3 (Hrsg. N. Yamazoe), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1991

-
- 9 F. Oehme, **Chemische Sensoren von heute und morgen**. 1. Auflage Expert Verlag Renningen-Mannheim, 1994
- 10 Frank Eichelbaum, Ralf Borngräber, Jens Schröder, Ralf Lucklum, Peter Hauptmann; **Interface circuits for quartz-crystal-microbalance sensors**; Review of Scientific Instruments, Vol. 70 Nr. 5, 1999
- 11 G. Sauerbrey, Mitteilung aus dem 1. Physikalischen Institut der TU Berlin A.E.U. 18 1964
- 12 F. L. Dickert, K. Halikias, **Sensors based on fingerprints of neutral and ionic analytes in polymeric materials**, Sensors and Actuators 1-4, 2001
- 13 Alberts, Johnson, Raff, Roberts, Walter, **Molekularbiologie der Zelle**, Wiley-VCH, 4. Auflage
- 14 Arnold M. Raem, Peter Rauch, **Immunoassays**, Spektrum Akademischer Verlag
- 15 C. Brack, M. Hirama, R. Lennard-Schuller, S. Tonegawa, **A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination**, 1978
- 16 A.C. Vallu, M. Yabuki, E.D. Larson, N. Maizels, **AID in antibody perfection** 2006
- 17 Neil A. Campbell, Jane B. Reece, **Biologie**, 6. Auflage, Spektrum Verlag 2003
- 18 Geoffrey L. Zubay, **Biochemie**, 4. Auflage Mc Graw Hill 1999
- 19 Abbas, Lichtman, Prober, **Cellular and Molecular Immunology**, W.B. Saunders 1999

20 Antonio Pezzutto, Timo Ulrichs, Gerd-Rüdiger Burmester, **Taschenatlas der Immunologie**, 2. Auflage Thieme Verlag

21 Eberhard Passarge, **Taschenatlas der Genetik**, 2. Auflage Thieme Verlag, 2004

22 www.wikipedia.org

23 S. Dreschers, C. A. Dumitru, C. Adams, E. Gulbins, **The cold case: Are rhinoviruses perfectly adapted pathogens?**, Cell. Mol. Life Sci. Vol. 64 2007

24 N. Verdaguer, D. Blaas² and I. Fita, **Structure of Human Rhinovirus Serotype 2 (HRV2)**, J. Mol. Biol. (2000) 300, 1179±1194

25 F. L. Dickert, O. Hayden, R. Bindeus, K. J. Mann, **Bioimprinted QCM sensors – screening of plant saps**, Anal. Bioanal. Chem. 378: 1929, 2004

26 Greve, J. M., Forte, C. P., Marlor, C. W., Meyer, A. M., Hoover-Litty, H., Wunderlich, D., McClelland, A. **Mechanisms of receptor-mediated rhinovirus neutralization defined by two soluble forms of ICAM-1**. J. Virol. 65. 1991

27 Hofer, F., Gruenberger, M., Kowalski, H., Machat, H., Huettinger, M., Kuechler, E. and Blass, D. **Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 1994

28 <http://www2.vetmed.uni-muenchen.de/med2//skripten/b5-1.html>

29 Bachrach H. L. 1968, **Foot and Mouth Disease**, Annu. Rev. Microbiol. 22: 201-244.

-
- 30 Rueckert R. R. Picornaviridae: **The viruses and their replication**, 609-654. In N. B. Fields, D.M. Knipe, P. H. Howley (ed.), Fields Virology, 3. Auflage Lippincott-Raven, 1996
- 31 T. Jackson, A. M. King, A. D. Stuart, E. Fry, **Structure and Receptor Binding**, Virus Res. 91, 33-46, 2003
- 32 J. R. Thompson, S. Wetzel , M. M. Klerks, D. Vasková, C. D. Schoen, J. Spak, W. Jelkmann **Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control**, Journal of Virological Methods 11, 2003
- 33 <http://www.biokurs.de/skripten/13/bs13-9.htm>
- 34 <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d35/35tmv.htm#Range>
- 35 V. Prakash, P. K. Nandi, J. Agric. Food Chem. 26, 1978
- 36 http://www.uni-graz.at/~katzner/germ/Sesa_ind.html
- 37 L. A. Johnson, T. M. Suleiman, E. W. Lusas, **Sesame Protein: A Review and Prospectus**, J. AM. Oil Chemists Soc. Vol. 56, 1979
- 38 G. Kanny, C. De Hauteclouque, D.A. Moneret-Vautrin, **Sesame seed and sesame seed oil contain masked allergens of growing importance**, Allergy 1996, 51,
- 39 K. Schöringhuber, M. Cichna-Markl, **Development of a Real-Time PCR Method To Detect Potentially Allergenic Sesame (*Sesamum indicum*) in Food**, J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 10540–10547

-
- 40 K. Beyer, L. Bardina, G. Grishina, H. A. Sampson, **Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage as common food allergens**, Journal of Allergy and Clinical Immunology 110, 2002
- 41 R. E. Poms, C. L. Klein, E. Anklam, **Methods for Allergen analysis in food: a review**, Food Additives and Contaminants, Vol. 21, No. 1, 2004
- 42 Mathias Otto, **Analytische Chemie**, 2. Auflage, Wiley-VCH
- 43 <http://www.sinnesphysiologie.de/methoden/fluo/fluomikl.htm>
- 44 <http://www.unisaarland.de/fak7/hartmann>
- 45 http://www.nikoninstruments.com/information_center.php#
- 46 <http://www.juelich-bonn.com/site/mikroskop/texte/fluoreszenz>
- 47 F. L. Dickert M. Tortschanoff, W. E. Bulst, G. Fischerauer; **Molecularly Imprinted Sensor Layers for the Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water**; Analytical Chemistry 71, 1999
- 48 L. Larsson, B. Sorbo, H.-G. Tiselius, S. Ohman, **A method for quantitative wet chemical analysis of urinary calculi**, Clinica Chimica Acta 140 (1) 1984
- 49 Daimay Lin-Vien, Norman B. Colthup, William G. Fateley, Jeanette G. Grasselli, **The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules**, Academic Press Inc. 1991
- 50 http://www2.uni-jena.de/biologie/biochemphys/biochem/Lehre/versuch_7.pdf
- 51 M. J. Grubman, B. Baxt, **Foot-and-Mouth Disease**, Clinical Microbiological Reviews, 2004, p. 465–493 Vol. 17, No. 2, 465–493.

52 O. Hayden, R. Bindeus and F. L. Dickert, **Combining atomic force microscope and quartz crystal microbalance studies for cell detection** *Sci. Technol.* **14** 1876-1881, 2003

53 Shiming Lin, Yu-Ming Wang , Long-Sun Huangb, Chii-Wann Lin, Su-Ming Hsud, Chih-Kung Lee, **Dynamic response of glucagon/anti-glucagon pairs to pulling velocity and pH studied by atomic force microscopy**, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 1013–1019

54 Zhanjun Yanga, Zhifeng Fua, Feng Yanb, Hong Liua, Huangxian Jua, **A chemiluminescent immunosensor based on antibody immobilized carboxylic resin beads coupled with micro-bubble accelerated immunoreaction for fast flow-injection immunoassay**, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 35-40

55 Songbai Zhang, Fan Zheng, ZaishengWu, Guoli Shen, Ruqin Yu; **Highly sensitive electrochemical detection of immunospecies based on combination of Fc label and PPD film/gold nanoparticle amplification**, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 129-135

56 P. A. Lieberzeit, A. Afzal, D. Podlipna, S. Krassnig, H. Blumenstock, F. L. Dickert; **Printing materials in micro- and nano-scale: Systems for process control**; *Sensors and Actuators B* 126 (2007) 153–158

57 P. A. Lieberzeit, A. Afzal, D. Podlipna, S. Krassnig, H. Blumenstock, F. L. Dickert; **Printing materials in micro- and nano-scale: Systems for process control**; *Sensors and Actuators B* 126, 153, (2007)

58 H. Fraenkel-Conrat, R. C. Williams; **Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive proteins and nucleic acid components**; *Proceedings of the National Academy of the sciences of the United States of America*

59 Dissertation Dr. Karl-Jürgen Mann

Lebenslauf

Personalien

Name	Romana Schirhagl
Geburtsdatum	26.08.1984
Geburtsort	Linz
Staatsangehörigkeit	Österreich
Familienstand	ledig

Schulbildung

1990-1991	VorschuleVolksschule Lichtenberg
1991-1992	Volksschule Lichtenberg
1992-1995	Volksschule 2 Tabor
1995-1999	Bundesrealgymnasium Steyr Unterstufe
1999-2003	Bundesrealgymnasium Steyr Oberstufe
	Reifeprüfung: 06/2003

Studium

2003 - 2007	Studium der Chemie an der Universität Wien
02/2007- 09/2007	Diplomarbeit mit dem Titel „QCM-Sensor basierend auf einem synthetischen Immunglobulin“ bei Prof. Dr. F. L. Dickert am Institut für Analytische Chemie
ab 09/2007	Dissertation bei Prof. Dr. F. L. Dickert am Institut für Analytische Chemie