
Bachelorarbeit

Frau
Sarah Haenelt

**Entwicklung eines Verfahrens zum quantitativen
Nachweis des Biomarkers TIMP-1 in Urinproben
in einem Lab-on-a-chip-System**

Mittweida, 2017

Fakultät Angewandte Computer- und
Biowissenschaften

Bachelorarbeit

**Entwicklung eines Verfahrens zum quantitativen
Nachweis des Biomarkers TIMP-1 in Urinproben
in einem Lab-on-a-chip-System**

Autor:
Frau

Sarah Haenelt

Studiengang:
Biotechnologie

Seminargruppe:
BT14wM-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:
Dr. rer. med. Natalia Sandetskaya

Einreichung:
Leipzig, 11.08.2017

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2017

Bibliographische Beschreibung:

Haenelt, Sarah:

Entwicklung eines Verfahrens zum quantitativen Nachweis des Biomarkers TIMP-1 in Urinproben in einem Lab-on-a-chip-System. 2017.

Seitenzahl Verzeichnisse: 11 – Seitenzahl Inhalt: 49 – Seitenzahl Anhänge: 5

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Forschungsmodul, 2017

Englischer Titel

Development of a strategy for the quantitative detection of the biomarker TIMP-1 in urine samples in a lab-on-a-chip system

Kurzbeschreibung:

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Assay entwickelt, um den Biomarker TIMP-1 quantitativ nachzuweisen. Dafür wurden in einem ersten Schritt homogene und heterogene Immunoassays hinsichtlich ihrer Eignung zum Nachweis von Biomarkern in Urinproben untersucht. Die beiden homogenen Immunoassays SPARCL und AlphaLISA erwiesen sich als nicht geeignet. Inhibitoren aus dem Urin, wie zum Beispiel Ascorbinsäure, störten bei diesen Assays die Signalgebung. Für den heterogenen Immunoassay wurden drei verschiedene Strategien für die Immobilisierung des Fänger-Antikörpers auf Polystyrol entwickelt und ihre Effektivität verglichen. Bei der Immobilisierung des Antikörpers durch Adsorption an der Oberfläche zeigte der Assay die höchste Empfindlichkeit für den Biomarker TIMP-1. Diese Immobilisierungsstrategie wurde auf einen Mikrochip übertragen. Die quantitative Detektion verschiedener Biomarker-Konzentrationen auf dem Chip konnte realisiert werden. Um die Empfindlichkeit des Assays zu erhöhen, müssen das Chip-Design verändert und die Detektionsmethode optimiert werden.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	IV
Formelverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Der Biomarker TIMP-1	2
1.2 Immunoassays.....	3
1.2.1 ELISA	5
1.2.2 AlphaLISA.....	7
1.2.3 SPARCL	8
1.2.4 Mikrofluidische Immunoassays	11
1.3 Einfluss der Proben-Matrix auf die Immunoassays	12
2 Zielstellung	13
3 Material.....	14
3.1 Chemikalien	14
3.2 Medien	15
3.3 Molekularbiologische Reagenzien.....	16
3.4 Material	17
3.5 Geräte.....	17
3.6 Software	17
4 Methoden	18
4.1 Untersuchungen zur Eignung homogener Immunoassays.....	18
4.1.1 Durchführung eines SPARCLs	18
4.1.2 Durchführung eines AlphaLISAs	20
4.1.3 Erstellen einer Kalibrierkurve.....	21
4.1.4 Einfluss von Ascorbinsäure	21
4.1.5 Aufkonzentrierung der Probe mit Zentrifugen-Filtereinheiten.....	22
4.2 Immobilisierungsstrategien für heterogene Immunoassays.....	23
4.2.1 Durchführung eines ELISA	23

4.2.2	Immobilisierung durch Adsorption.....	24
4.2.3	Immobilisierung mit APTES	24
4.2.4	Immobilisierung mit CMD	25
4.2.5	Optimierung der Immobilisierung mit Carboxymethyldextran	26
4.3	Übertragen des Immunoassays auf einen Mikrochip.....	27
4.3.1	Durchführung eines ELISA auf dem Chip	28
4.3.2	Detektion des Farbumschlags	29
4.3.3	Auswertung der Messergebnisse	29
4.3.4	Reproduzierbarkeit des Assays auf dem Chip	30
5	Ergebnisse.....	31
5.1	Eignung homogener Immunoassays	31
5.1.1	Erstellen einer Kalibrierkurve.....	31
5.1.2	Einfluss von Ascorbinsäure	32
5.1.3	Aufkonzentrierung der Proben mit Zentrifugen-Filtereinheiten.....	32
5.2	Immobilisierungsstrategien für heterogene Immunoassays.....	33
5.3	Übertragen des Assays auf einen Mikrochip	36
5.3.1	ELISA auf der Nunc-Platte.....	36
5.3.2	ELISA auf dem PC-Chip	37
5.3.3	ELISA auf dem PS-Chip.....	38
5.3.4	Reproduzierbarkeit des Assays	38
6	Diskussion	40
6.1	Eignung homogener Immunoassays	40
6.2	Immobilisierungsstrategien für heterogene Immunoassays.....	41
6.3	Übertragen des Assays auf einen Mikrochip	43
7	Ausblick	47
8	Zusammenfassung	48
9	Summary.....	49
	Literaturverzeichnis	VIII
	Anhang.....	XII
	Selbstständigkeitserklärung.....	XVII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Aufbau eines Antikörpers	4
Abbildung 2	ELISA-Prinzipien	6
Abbildung 3	Funktionsweise des AlphaLISAs.....	8
Abbildung 4	SPARCL als nicht-kompetitiver Assay an einer festen Oberfläche	9
Abbildung 5	SPARCL als nicht-kompetitiver Assay in Lösung	10
Abbildung 6	SPARCL als kompetitiver Assay in Lösung	10
Abbildung 7	Durchführung eines SPARCLs.....	19
Abbildung 8	Durchführung eines AlphaLISAs	20
Abbildung 9	Durchführung eines ELISAs.....	24
Abbildung 10	Immobilisierung mit APTES	25
Abbildung 11	Immobilisierung mit CMD	26
Abbildung 12	Maße des verwendeten Mikrochips	28
Abbildung 13	Auswertung der Messung	30
Abbildung 14	Empfindlichkeit von SPARCL und AlphaLISA.....	31
Abbildung 15	Signalabschwächung durch Ascorbinsäure bei SPARCL und AlphaLISA	32
Abbildung 16	Aufkonzentrierung der TIMP-Probe mit Zentrifugen-Filtereinheiten.....	33
Abbildung 17	Vergleich der drei Immobilisierungsstrategien hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit	34
Abbildung 18	Optimierung der Immobilisierung mit CMD mithilfe eines FITC- markierten Oligonukleotids	34
Abbildung 19	pH-Anpassung mit Borat-Puffer bei der Immobilisierung mit CMD.....	35
Abbildung 20	ELISA auf der Nunc-Platte.....	36
Abbildung 21	ELISA auf dem PC-Chip.....	37
Abbildung 22	ELISA auf dem PS-Chip	38
Abbildung 23	Reproduzierbarkeit des Assays auf dem PC-Chip.....	39
Abbildung 24	Mikrochip-Rahmen als 1536-well Mikrotiterplatte betrachtet	XIV
Abbildung 25	Parameter für "Absorbance Repeated"	XIV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Pipettierschema, Einfluss von Ascorbinsäure auf SPARCL und AlphaLISA	22
Tabelle 2 Pipettierschema, Aufkonzentrierung der Proben	22
Tabelle 3 Werte, Kalibrierkurve SPARCL	XII
Tabelle 4 Werte, Kalibrierkurve AlphaLISA	XII
Tabelle 5 Berechnungen zu LOD- und LOQ-Werten.....	XII
Tabelle 6 Werte, Einfluss von Ascorbinsäure auf SPARCL	XII
Tabelle 7 Werte, Einfluss von Ascorbinsäure auf AlphaLISA.....	XIII
Tabelle 8 Werte, Aufkonzentrierung der Probe	XIII
Tabelle 9 Werte, Immobilisierungsstrategien für heterogene Immunoassays, Absorption bei 450 nm	XIII
Tabelle 10 Werte, Optimierung der CMD-Immobilisierung mit FITC	XIV
Tabelle 11 Werte, Kalibrierkurve auf dem Chip	XV
Tabelle 12 Werte, Reproduzierbarkeit des Assays auf dem PC-Chip	XVI

Formelverzeichnis

Formel 1 Berechnung des LOD-Werts 21
Formel 2 Berechnung des LOQ-Werts 21

Abkürzungsverzeichnis

AA	ascorbic acid (Ascorbinsäure)
Acr-Ab	acridan-labeled antibody (Acridan-markierter Antikörper)
AlphaLISA	Alpha-linked immunosorbent assay
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
BGR	background-reducing agent (Hintergrund-reduzierendes Mittel)
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cap-Ab	capture antibody (Fänger-Antikörper)
CMD	Carboxymethyldextran
dBGR	diluted BGR (verdünntes BGR)
Det-Ab	detection antibody (Detektions-Antikörper)
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMF	Diemethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dtl.	Deutschland
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid-Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
K	Kontrolle
LOD	limit of detection (Detektionslimit)
LOQ	limit of quantification (Quantifizierungslimit)
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MW	Mittelwert
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PBST	PBS mit Tween-20

PC	Polycarbonat
PS	Polystyrol
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RG	Mikroreaktionsgefäß
RLU	relative light units (relative Lichteinheiten)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SA	Streptavidin
SMT	self-made trigger (selbst hergestellter Trigger)
SPARCL	Spatial Proximity Analyte Reagent Capture Luminescence
StAbw	Standardabweichung
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinases
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRIS-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid

1 Einleitung

Die erfolgreiche Behandlung von vor wenigen Jahren noch lebensbedrohlichen Krankheiten lassen die Lebenserwartung in Deutschland immer weiter steigen. Gleichzeitig steigt jedoch auch die Krebserkrankungsrate an. Woran liegt das? Mit zunehmendem Alter wächst auch die Wahrscheinlichkeit, an Krebs zu erkranken [URL-01]. Im Jahr 2015 war knapp jeder vierte Todesfall auf bösartige Neubildungen zurückzuführen. Damit ist Krebs nach Erkrankungen des Kreislaufsystems derzeit die zweithäufigste Todesursache in Deutschland [URL-02]. Zahlen des statistischen Bundesamtes belegen, dass krebskranke Männer in den letzten Jahren größtenteils an Lungenkrebs gestorben sind. Danach folgten bösartige Neubildungen der Prostata [URL-03].

Für Prostatakrebs wurde ein Früherkennungstest entwickelt, welcher die Konzentration des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Blut des Patienten misst. Bisher ist dieser PSA-Test der einzige marktfähige Früherkennungstest für Prostatakrebs. Er ist jedoch sehr umstritten, da er als äußerst fehlerbehaftet gilt. In der Regel ist das PSA-Level bei Patienten mit einem Prostatakarzinom erhöht. Der Wert steigt allerdings auch mit zunehmendem Alter, durch körperliche Anstrengungen und bei Entzündungen der Prostata an. Momentan gibt es also keinen Richtwert, welche Konzentration an PSA im Blut als Standard angesehen werden kann. [URL-04]. Bereits seit etlichen Jahren laufen deshalb Studien, die die Zuverlässigkeit dieser Screening-Methode untersuchen. Bisher konnte der Nutzen des PSA-Tests für die Krebsfrüherkennung weder eindeutig bewiesen noch widerlegt werden. Da eine frühe Diagnose jedoch äußerst wichtig für eine erfolgreiche Therapie ist, wird derzeit intensiv nach alternativen Verfahren gesucht [URL-05]. Dabei liegt ein Fokus der Forschung auf dem Ersatz des prostataspezifischen Antigens durch einen besser geeigneten Biomarker.

1.1 Der Biomarker TIMP-1

Ein für einen Früherkennungstest in Frage kommender Biomarker ist das Glykoprotein *tissue inhibitor of metalloproteinases 1* (TIMP-1). Ursprünglich wurde angenommen, dass TIMPs ausschließlich als Inhibitoren für sogenannte Matrix-Metalloproteinasen (MMP) dienen (Brew, 2010). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass sie auch an zellulären Prozessen wie Apoptose, Zellwachstum, Differenzierung oder Angiogenese beteiligt sind. In der Krebsforschung steht jedoch ihre Rolle als Inhibitoren von MMPs weiterhin im Vordergrund. MMPs sind in der Lage, Membranproteine zu zerstören und die extrazelluläre Matrix aufzulösen. Dieser Prozess ermöglicht Tumorzellen die Invasion in umliegendes Gewebe (Durkan, 2003). Das erklärt, warum die Proteine der TIMP-Familie in der Krebsforschung eine so wichtige Rolle spielen (Gong, 2014).

Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass die Konzentration an TIMP-1 in Tumorgeweben verändert ist. Während früher noch davon ausgegangen wurde, dass TIMPs antitumorale und antimetastatische Effekte haben, zeigen viele neuere Studien eher das Gegenteil. Erhöhte TIMP-1-Level korrelierten bei Krebskranken häufig mit einer verringerten Überlebensrate (Curran, 1999). Studien haben gezeigt, dass im Blut von Patienten mit Blasenkrebs die Menge an zirkulierendem TIMP-1 höher ist, als bei gesunden Vergleichspatienten (Naruo, 1994). In Prostata-Krebs-Gewebe war hingegen die Expression von TIMP-1 niedriger als bei gesunden Probanden (Gong, 2014). Um den Zusammenhang zwischen der Expressionsrate an TIMP-1 im Körper eines Patienten und einer Krebserkrankung aufzuklären, sind noch weitere Studien nötig.

Geringe Mengen des Biomarkers bis zu wenigen ng/ml werden über den Urin ausgeschieden (Ricci, 2015). Die quantitative Detektion von TIMP-1 in Urinproben würde deshalb einen sehr patientenfreundlichen Früherkennungstest für Prostata- und Blasenkrebs ermöglichen. Zudem könnte ein solcher Test auch für die Diagnose anderer Krankheiten genutzt werden, bei denen sich die Konzentration eines krankheitsspezifischen Biomarkers im Urin verändert.

1.2 Immunoassays

Der Immunoassay ist ein in der Diagnostik häufig angewendetes Verfahren zur Quantifizierung eines Analyten in einer Probe. Das zugrundeliegende Prinzip ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Der Analyt als Antigen bindet hierbei spezifisch an einen passenden Antikörper. Um den Nachweis quantitativ gestalten zu können, wird der verwendete Antikörper radioaktiv, enzymatisch oder fluoreszent markiert und die Aktivität des Markers gemessen. Im Ausnahmefall wird statt des Antikörpers das Antigen markiert (Ibrahim, 2006). Durch Antikörper lassen sich eine unendliche Vielzahl an Proteinen, Chemikalien, Zellen und Viren detektieren. In der medizinischen Diagnostik werden Immunoassays häufig verwendet, um Biomoleküle, wie zum Beispiel Hormone oder DNA, zu untersuchen. Es können jedoch auch die Konzentrationen kleinster chemischer Verbindungen bestimmt werden. Deshalb finden Immunoassays in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik ebenfalls Anwendung (Luttmann, 2009). Hier werden Proben zum Beispiel auf Pestizide oder Medikamentenrückstände getestet (Kaufman, 1991).

Die Antikörper spielen bei der Durchführung eines Immunoassays eine zentrale Rolle. Eine Quantifizierung kann nur erfolgen, wenn diese spezifisch an den nachzuweisenden Analyten binden. Ist dies der Fall, gelingt meistens auch der Nachweis von sehr geringen Konzentrationen eines Analyten. Da die Bindung spezifisch ist, wirken in aller Regel selbst Substanzen, welche eine sehr ähnliche Struktur zum Analyten aufweisen, nicht störend. Entscheidend für die Spezifität eines Antikörpers ist vor allem die Stärke der Antigen-Antikörper-Bindung (Wild, 2005).

Antikörper sind Proteine mit kovalent gebundenen Zuckermolekülen, sogenannte Glykoproteine. Wie in Abbildung 1 dargestellt, setzt sich jeder Antikörper aus zwei leichten (grün) und zwei schweren Ketten (blau) zusammen. Beide sind über Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Die C-terminale Region jeder Kette ist konstant, während die N-terminale Region variabel ist. Das Antigen bindet immer an die variable Region des Antikörpers (Rehm, 2006).

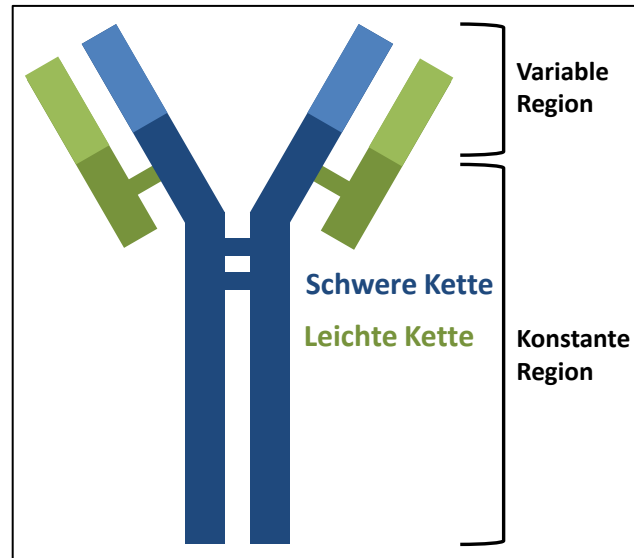


Abbildung 1 Aufbau eines Antikörpers

Der Abschnitt eines Antigens, an den ein Antikörper spezifisch binden kann, wird als Epitop bezeichnet [URL-06]. Es wird zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern unterschieden. Während monoklonale Antikörper lediglich an ein Epitop binden, sind polyklonale Antikörper in der Lage, an mehrere verschiedene Epitope eines Antigens zu binden. Dabei ist jedoch nicht ein und derselbe Antikörper für verschiedene Epitope spezifisch. Es handelt sich um ein Gemisch verschiedener Antikörper, die an unterschiedliche Epitope desselben Antigens binden (Luttmann, 2009).

Es wird allgemein zwischen heterogenen und homogenen Immunoassays unterschieden. Ein klassisches Beispiel für einen heterogenen Immunoassay ist der ELISA. Dieser Assay funktioniert nur, wenn die ungebundenen Marker entfernt werden bevor das Signal gemessen wird. Würde die feste Phase bei diesen Prinzipien nicht gespült werden, wäre das Signal bei jeder Konzentration an Analyt gleich hoch. Da das ständige Waschen nach jedem Inkubationsschritt jedoch sehr aufwendig ist, wurden in den letzten Jahren homogene Immunoassays entwickelt. Nur an den Analyten gebundene Marker generieren hier ein Signal. Dadurch fallen die bei heterogenen Assays zwingend erforderlichen Waschstreps weg (Wild, 2005).

1.2.1 ELISA

Ein sehr häufig eingesetzter heterogener Immunoassay ist der *enzyme-linked immunosorbent assay*, kurz auch ELISA genannt. Bei diesem Assay ist der Marker ein Enzym und der quantitative Nachweis des Analyten erfolgt über eine enzymatische Farbreaktion. Da ein einzelnes Enzym bereits sehr viel Substrat umsetzen kann, kommt es hierbei zu einer Signalverstärkung. Ein ELISA ist deshalb sehr sensitiv (Rehm, 2006).

Das Entscheidende für den Assay ist also der sogenannte Nachweiskomplex. Er besteht aus einem Enzym und einem zumeist farblosen Substrat, welches bei Zugabe zum Assay von dem Enzym in ein farbiges Produkt umgesetzt wird (Clark, 2009). Die dabei am häufigsten verwendeten Enzyme sind die Alkalische Phosphatase und die Meerrettich-Peroxidase. Je nach der erforderlichen Sensitivität und der Detektionsmethode werden unterschiedliche Substrate zur Umsetzung verwendet [URL-06].

Ein Assay mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wird ebenfalls als ELISA bezeichnet, wenn ansonsten das gleiche Prinzip zugrunde liegt. Fluoreszenzmarker beschleunigen die Durchführung, allerdings ist der Nachweis auch weniger empfindlich (Rehm, 2006). Beim ELISA wird zunächst der Analyt an einer festen Oberfläche immobilisiert. Das erfolgt entweder durch einen Antikörper oder durch Adsorption. Dann wird der markierte Antikörper hinzugegeben und der Assay gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Wenn nun das Substrat hinzugegeben wird, kommt es zu einer Farbreaktion. Das an den Antikörper gekoppelte Enzym setzt das Substrat um. Die Intensität der Färbung kann dann detektiert werden und ist ein Maß für die Konzentration an Analyt in der Probe (Clark, 2009).

Der ELISA kann in direkten, indirekten, nicht-kompetitiven und kompetitiven ELISA unterteilt werden (Abbildung 2).

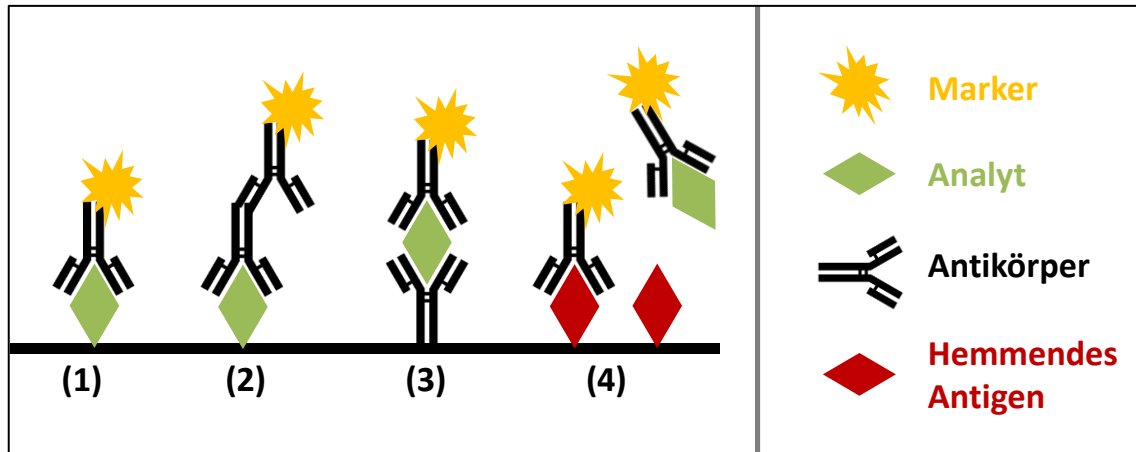


Abbildung 2 ELISA-Prinzipien (1) direkter ELISA (2) indirekter ELISA (3) nicht-kompetitiver ELISA (4) kompetitiver ELISA

Beim direkten ELISA (1) wird der Analyt an die Oberfläche gebunden und dann direkt der markierte Antikörper zugegeben. Dieses Verfahren ist zeitsparend, da mit nur einem Antikörper gearbeitet wird und so ein Waschschrift und eine Inkubationszeit eingespart werden können. Allerdings ist es sehr kostenintensiv, für jedes ELISA-System einen neuen spezifischen Antikörper zu markieren. Deshalb wird eher der indirekte ELISA verwendet.

Beim indirekten ELISA (2) wird mit einem spezifischen primären Antikörper und einem markierten sekundären Antikörper gearbeitet. Der primäre Antikörper bindet an den Analyten und der sekundäre Antikörper dann an den primären. Da die sekundären Antikörper nicht spezifisch für den Analyten sind, können sie in anderen Assays wiederverwendet werden. Außerdem binden sie meist an mehrere Epitope eines primären Antikörpers, so dass es zu einer Signalverstärkung kommt. Dadurch wird jedoch auch ein weiterer Inkubations- und Waschschrift nötig, was dieses Verfahren zeitaufwendiger macht.

Der nicht-kompetitive ELISA (3) zeichnet sich durch hohe Spezifität und Sensitivität aus. Hier wird der primäre Antikörper an die Oberfläche gebunden. Dann wird der Analyt zugegeben und bindet am primären Antikörper. Der sekundäre markierte Antikörper bindet dann an den Komplex aus Antigen und primären Antikörper und dient zur Konzentrationsbestimmung des Analyts.

Der kompetitive ELISA (4) wird auch als hemmender ELISA bezeichnet. Hierfür werden Antigene an die Oberfläche gebunden. Dann erfolgt zunächst die Inkubation der markierten primären Antikörper mit den Analyten aus der Probe. Die entstandenen

Antigen-Antikörper-Komplexe werden zu den an der Oberfläche gebundenen Antigenen gegeben. Nur die zuvor ungebundenen Antikörper sind nun in der Lage an die hemmenden Antigene zu binden. Je mehr Analyt in der Probe war, desto weniger Antikörper können jetzt noch an die hemmenden Antigene binden und desto schwächer fällt nach dem Waschen auch das Signal aus [URL-06].

1.2.2 AlphaLISA

Der ELISA ist zwar ein sehr häufig eingesetzter Immunoassay (Clark, 2009), hat jedoch einen entscheidenden Nachteil. Er erfordert mehrere Waschschritte, was eine Automatisierung und einen hohen Durchsatz schwierig bis unmöglich macht. Deshalb haben kanadische Wissenschaftler eine miniaturisierbare und automatisierbare Alternative zum klassischen ELISA entwickelt. Der *Alpha-linked immunosorbent assay*, kurz AlphaLISA, ist ein homogener Lumineszenz-Immunoassay. Er erfordert keine Waschschritte.

Wie in Abbildung 3 dargestellt, gibt es für diesen Assay zwei Prinzipien. Der nicht-kompetitive AlphaLISA (1) funktioniert nach dem Sandwich-Prinzip. An ein streptavidiniertes Donator-Bead bindet ein biotinylierter Antikörper. Dieser ist, genau wie der zweite benötigte Antikörper, spezifisch für den Analyten. Der zweite Antikörper ist an ein Akzeptor-Bead gebunden. Wenn beide Antikörper an den Analyten binden, kommt der Donator-Bead in unmittelbare Nähe zum Akzeptor-Bead (Beaudet, 2008).

Durch die Anregung des Donator-Beads bei einer Wellenlänge von 680 nm wird Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) frei. Dieser angeregte Sauerstoff initiiert eine Kette von Reaktionen im Akzeptor-Bead, in Folge dessen emittiert dieser Licht einer Wellenlänge von 615 nm. Dieses Phänomen wird als Chemolumineszenz bezeichnet (Ullman, 1996).

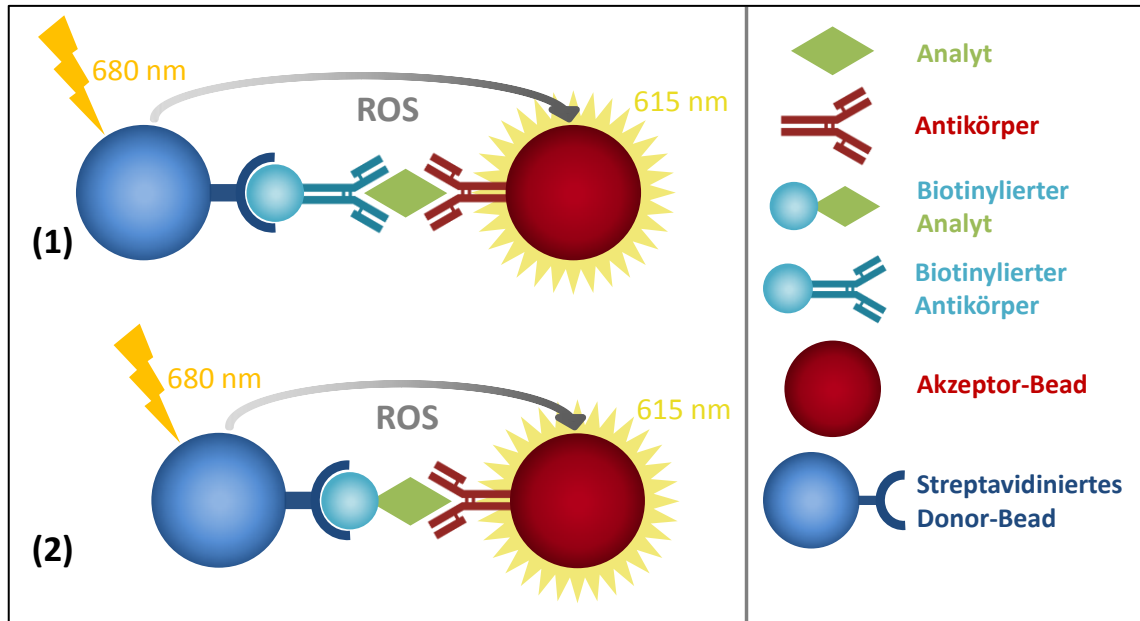


Abbildung 3 Funktionsweise des AlphaLISAs (1) nicht-kompetitiver AlphaLISA (2) kompetitiver AlphaLISA nach [URL-07]

Der AlphaLISA lässt sich einfach miniaturisieren, ohne dadurch die Sensitivität zu beeinflussen. Das senkt nicht nur die Kosten, sondern steigert auch den Durchsatz. Außerdem ist dieser Assay durch das Wegfallen aller Waschschrte schneller und erfordert deutlich weniger praktische Erfahrungen der Mitarbeiter im Labor (Beaudet, 2008). Hinzu kommt, dass mit geringen Probenvolumen eine große Bandbreite an Analyten detektiert werden kann. Allerdings ist der AlphaLISA auch sehr störanfällig (Mata-Cantero, 2015). Er reagiert empfindlich auf intensive Beleuchtung und bestimmte Verbindungen im Assay können den Singulett-Sauerstoff abfangen, so dass kein Signal mehr generiert werden kann. Zudem wird ein hochenergetischer Laser zur Auswertung benötigt, welcher nicht immer zur Verfügung steht (Eglen, 2008).

1.2.3 SPARCL

Spatial Proximity Analyte Reagent Capture Luminescence (SPARCL) ist ebenfalls ein homogener Lumineszenz-Immunoassay (Akhavan-Tafti, 2013).

Er ähnelt in seiner Funktionsweise stark dem AlphaLISA, verwendet jedoch andere Reagenzien für die Erzeugung der Chemolumineszenz. Während das Lumineszenz-Signal beim AlphaLISA durch eine Anregung mit Licht verursacht wird, sorgt bei SPARCL das Umsetzen eines Substrats für die erforderliche Reaktion [URL-08]. Da der SPARCL ohne Waschschrte und spezielle Bestandteile oder komplizierte Reaktionen auskommt, ist er sehr einfach zu handhaben. Deshalb lässt sich diese

Methode leicht auch auf andere Assays übertragen (Akhavan-Tafti, 2013). Das Substrat Acridan wird durch die Antigen-Antikörper-Bindung in unmittelbare Nähe zu dem oxidativen Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gebracht. Bei Zugabe einer Trigger-Lösung mit Wasserstoffperoxid und p-Hydroxyzimtsäure kommt es zur Emission von Licht, dessen Intensität proportional zur Menge an Analyt in der Probe ist.

Der Assay ist, wie der ELISA, nach jedem möglichen Prinzip durchführbar. In Abbildung 4 ist der nicht-kompetitive SPARCL an einer festen Oberfläche dargestellt. Das Substrat Acridan und ein für den Analyten spezifischer Antikörper werden an die Oberfläche gebunden. Nun wird die Probe mit dem Analyten sowie ein mit Meerrettichperoxidase (HRP) markierter Antikörper hinzugegeben. Der Analyt bindet an den spezifischen Antikörper an der Oberfläche, der markierte Antikörper wiederum an den Analyten. Es entsteht ein klassischer Sandwich-Assay. Durch die Bindung kommen HRP und Acridan in unmittelbare Nähe zueinander. Bei Zugabe der Trigger-Lösung setzt das Enzym HRP das Substrat Acridan um und es kommt dabei zu einer Lichtemission. Diese wird, wie beim AlphaLISA, durch Chemolumineszenz verursacht [URL-09].

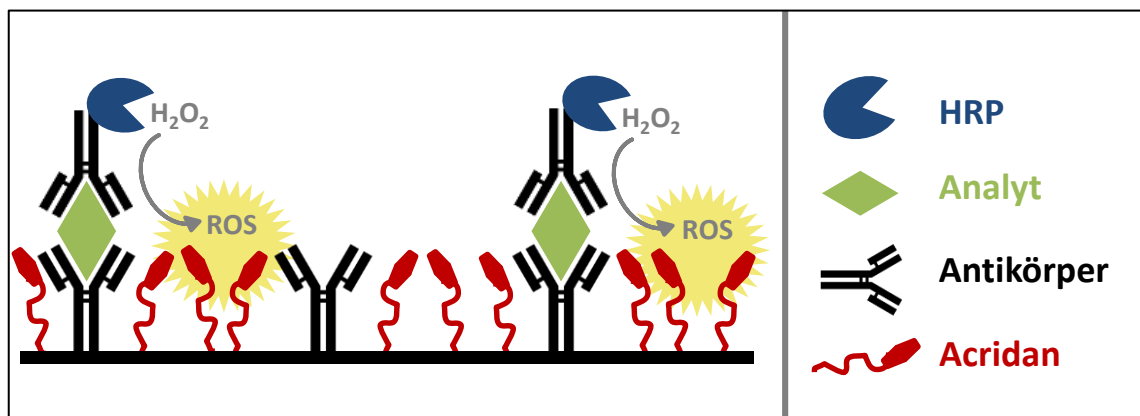


Abbildung 4 SPARCL als nicht-kompetitiver Assay an einer festen Oberfläche

In Lösung (Abbildung 5) läuft der nicht-kompetitive SPARCL sehr ähnlich ab. Allerdings ist hier das Rinderserumalbumin mit dem Substrat Acridan direkt an einen für den Analyten spezifischen Antikörper gebunden. Bei der Zugabe der Probe und der HRP-markierten Antikörper kommt das Acridan wieder in unmittelbare Nähe zum Enzym, so dass eine Umsetzung erfolgen kann.

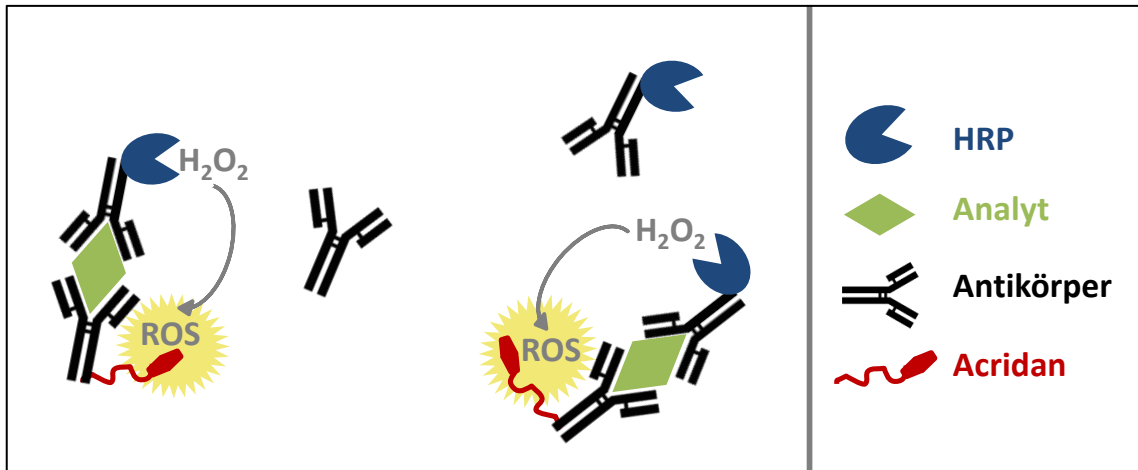


Abbildung 5 SPARCL als nicht-kompetitiver Assay in Lösung

In Abbildung 6 ist eine Variante des kompetitiven SPARCL in Lösung dargestellt. Hier werden das Enzym HRP und der zu untersuchende Analyt an Moleküle des cyclischen Adenosinmonophosphat, abgekürzt cAMP, gebunden. Beide Komplexe konkurrieren nun um die Bindestellen des Acridan-markierten Antikörpers. Je mehr Analyt in der Probe ist, desto mehr Antikörper binden an den Komplex aus cAMP und Analyt und desto schwächer fällt die Chemolumineszenz aus. Es handelt sich hierbei also um eine indirekte Proportionalität.

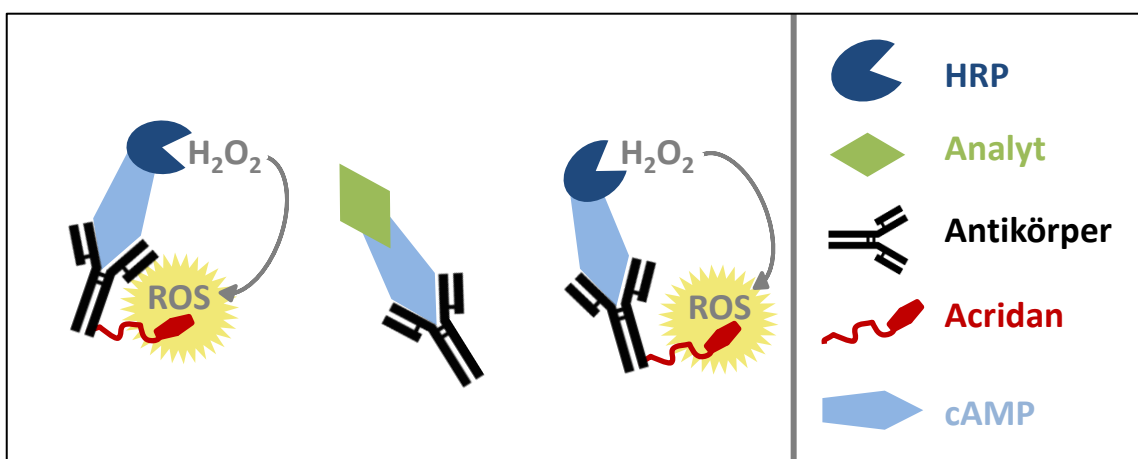


Abbildung 6 SPARCL als kompetitiver Assay in Lösung

Der SPARCL in Lösung bietet mehrere Vorteile. Zunächst ist hierbei keine Beschichtung einer Oberfläche nötig. Außerdem werden keine Beads benötigt. Zudem läuft ein Assay in Lösung schneller ab als gebunden und stellt eine natürlichere biologische Umgebung dar als eine feste Oberfläche [URL-09].

1.2.4 Mikrofluidische Immunoassays

Mikrofluidische Immunoassays sind Miniaturisierungen von Assays im Großformat. Ziel ist es, alle benötigten Reagenzien und Geräte auf möglichst kleinem Raum unterzubringen und den Test weitestgehend zu automatisieren. So entsteht ein transportables Labor auf einem kleinen Chip, weshalb solche Systeme auch als *Lab-on-a-chip* bezeichnet werden. Für die Durchführung des Assays wird weder ein Labor noch speziell ausgebildetes Laborpersonal benötigt. Stattdessen kann eine erste Diagnose direkt im Krankenwagen, auf der Krankenstation oder während eines Hausbesuches gestellt werden (Lin, 2010). Ein weiterer entscheidender Vorteil mikrofluidischer Systeme ist die verkürzte Analysezeit. Der Hauptgrund für die lange Inkubationszeit eines Immunoassays ist die lange Strecke, die der Analyt zurücklegen muss, um zu den Antikörpern zu gelangen. Die Antigen-Antikörper-Reaktion an sich verläuft sehr zügig. In einem Mikrochip ist die Distanz die der Analyt zum Antikörper zurücklegen muss extrem minimiert. Das liegt vor allem daran, dass die Oberfläche der Reaktionskammern im Vergleich zum Volumen stark vergrößert ist. Der verkürzte Zeitaufwand ermöglicht eine schnellere Diagnose und das wiederum eine schnelle und gezielte Erstversorgung des Patienten (Rossier, 2001). Allerdings ist auch die Interaktion zwischen den Komponenten des Assays und der Oberfläche der Reaktionskammer erhöht, was verstärkt zu unspezifischen Bindungen führen kann (Henaresa, 2008).

Ein wichtiges Anwendungsfeld mikrofluidischer Immunoassays ist die Diagnostik von Infektionskrankheiten (Chin, 2011). Vor allem in ärmeren Ländern ist das nächste Krankenhaus meistens weit entfernt. Ein *Lab-on-a-chip* ermöglicht hier eine Diagnose vor Ort. Dabei ist von Vorteil, dass sowohl die Kontaminationsgefahr als auch das benötigte Probenvolumen auf einem Mikrochip sehr gering sind (Henaresa, 2008). So können Infektionskrankheiten auch in infrastrukturell schlecht erschlossenen Gebieten frühzeitig erkannt und Epidemien im besten Fall verhindert werden.

1.3 Einfluss der Proben-Matrix auf die Immunoassays

Menschlicher Urin besteht größtenteils aus Wasser. Darin gelöst befinden sich unter anderem Harnstoff, Ammoniak, Mineralien, verschiedene Säuren und auch geringe Mengen an Proteinen. Die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile schwanken von Person zu Person und je nach Zeitpunkt der Probenentnahme sehr stark [URL-10]. Das kann bei der Detektion von Biomarkern in Urinproben zu einem Problem werden. Besonders bei homogenen Immunoassays ohne Waschschrte könnten einige dieser Substanzen die Signalgebung stören und so eine Quantifizierung verhindern. Relevant sind hierbei vor allem Antioxidantien wie die Ascorbin- und die Harnsäure, da diese signalgebende Radikale aus dem Assay wegfangen. In Korrespondenz mit PerkinElmer wurde deshalb zur Verdünnung der Urinproben vor der Durchführung eines Tests geraten, um eine Beeinflussung durch die Probenmatrix zu vermeiden. Da dies bei sehr niedrigen Biomarker-Konzentrationen jedoch nicht möglich ist, muss der Einfluss der Radikalfänger genauer untersucht und wenn möglich eliminiert werden.

2 Zielstellung

Es soll ein Immunoassay auf einem Lab-on-a-chip-System etabliert werden. Dieser Assay soll den quantitativen Nachweis von Biomarkern in Urin ermöglichen.

Die vorliegende Forschungsarbeit soll die Eignung homogener und heterogener Immunoassays zum Nachweis des Biomarkers TIMP-1 in Urinproben untersuchen. Dabei soll der inhibierende Einfluss von Inhaltsstoffen des Urins, wie zum Beispiel der Ascorbinsäure, auf die homogenen Immunoassays untersucht werden. Für den heterogenen Immunoassay sollen verschiedene Immobilisierungsstrategien entwickelt und hinsichtlich ihrer Effektivität verglichen werden. Der am besten geeignete Immunoassay soll anschließend auf einen mikrofluidischen Chip übertragen werden.

Langfristig soll das mikrofluidische System in der klinischen Diagnostik als Urintest für die Erkennung von Prostata- und Blasenkrebs angewendet werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) #E6383, Sigma Aldrich Co. LLC (St. Louis, USA)

2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure-Monohydrat #69889, Sigma Aldrich Co. LLC (St. Louis, USA)

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) #860366, Sigma Aldrich Co. LLC (St. Louis, USA)

3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) #A3648, Sigma Aldrich Co. LLC (St. Louis, USA)

4-Hydroxyzimtsäure #C9008, Sigma Aldrich Co. LLC (St. Louis, USA)

Albumin, IgG-frei #3737, Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Dtl.)

Carboxymethyldextran 150 #20477, TdB Consultancy AB (Uppsala, Schweden)

Dimethylformamid (DMF) #D4551, Sigma Aldrich Co. LLC (St. Louis, USA)

Dimethylsulfoxid (DMSO) #A994, Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Dtl.)

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) #30435, Sigma Aldrich Co. LLC (St. Louis, USA)

Essigsäure 100% #20104.334, VWR International GmbH (Radnor, USA)

Ethanol 99 % #9065, Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Dtl.)

Ethylendiamintetraessigsäure (EDC) #8043, Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Dtl.)

Harnstoff #X999, Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Dtl.)

Kaliumchlorid (KCl) #6781.3, Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Dtl.)

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) #3904.1, Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Dtl.)

Kaliumhydroxid-Plätzchen #2702906, OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG (Bremen, Dtl.)

L(+)-Ascorbinsäure #6288, Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Dtl.)

Natriumacetat #71183, Sigma Aldrich Co. LLC (St. Louis, USA)

Natriumchlorid (NaCl) #10428420, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

N-Hydroxysulfosuccinimid (sulfo-NHS) #130672, Sigma Aldrich Co. LLC (St. Louis, USA)

Schwefelsäure #258105, Sigma Aldrich Co. LLC (St. Louis, USA)

TMB substrate solution #N301, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS-Base) #4855, Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Dtl.)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid (TRIS-HCl) #9090, Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Dtl.)

Tween-20 #9127, Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Dtl.)

Wasserstoffperoxid 30 % #9681, Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Dtl.)

3.2 Medien

Acetat-Puffer, 100 ml, pH 6.0
50 ml Essigsäure (0.1 M)
50 ml Natriumacetat (0.1 M)

Borat-Puffer , pH 9.2, 50 mM
BupHTM Borate Buffer Pack
In 500 ml dH₂O

dBGR

320 µl Lumigen SPARCL Background Reducing Agent (BGR)
948 µl dH₂O
12 µl Ethanol (99 %)

MES-Puffer, 100 mM, pH 5.0
19.52 g MES-Monohydrat
In 100 ml dH₂O

MES-Puffer, 25 mM, pH 5.0
4.88 g MES-Monohydrat
In 100 ml dH₂O

PBS 10X, pH 7.4
1.4 M NaCl
27 mM KCl
85 mM Na₂HPO₄
15 mM KH₂PO₄

PBS/BSA

1 % Albumin, IgG-frei (w/v)
In PBS-Puffer 1x

SMT, 10 ml
5000 µl Tris-HCl-Puffer, 50mM, pH 8.0
60.6 µl Harnstoff, 500 mg/ml

100 µl EDTA, 100mM, pH 8.2
20 µl Tween-20
322.5 µl Ethanol, 99 %
160 µl 4-Hydroxyzimtsäure in DMF, 0.5M
56.2 µl Wasserstoffperoxid, 30 %
4280.7 µl dH₂O

TMB-Substrat

20 µl TMB (10 µg/ml in DMSO)
1 µl Wasserstoffperoxid, 30 %
490 µl Acetat-Puffer

TRIS-HCl-Puffer, 100 ml, pH 8.0, 0.05 M

0.444 g Tris-HCl
0.265 g TRIS-Base
In 100 ml dH₂O

TRIS-Puffer, 100 ml, 1 M

12.14 g TRIS-Base
In 100 ml dH₂O

3.3 Molekularbiologische Reagenzien

Pierce™ High Sensitivity Streptavidin-HRP #21130, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Streptavidin-PolyHRP40 #SP40C, SDT GmbH (Baesweiler, Dtl.)

Human TIMP-1 DuoSet ELISA, 15Plate #DY970, LOT 336203, R&D Systems (Minneapolis, USA)

Mouse Anti-Human TIMP-1 Capture Antibody
Biotinylated Goat Anti-Human TIMP-1 Detection Antibody
Recombinant Human TIMP-1 Standard

SPARCL™ Detection Kit #SDK-10K, LOT 457437, Lumigen (Southfield, USA)

Lumigen SPARCL Labeling Reagent
BupH™ Borate Buffer Pack
Lumigen SPARCL Background Reducing Agent

Human Metalloproteinase Inhibitor 1 / Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP1) Kit #AL272, LOT 2011044, PerkinElmer Inc. (Waltham, USA)

AlphaLISA Anti-TIMP1 Acceptor beads
Streptavidin (SA)-coated Donor beads
Biotinylated Antibody Anti-TIMP1
AlphaLISA Immunoassay Buffer

Oligonukleotid, 21 bp mit FITC am 3'- und NH₂ am 5'-Ende, Sigma Aldrich Co. LLC (St. Louis, USA)

3.4 Material

OptiPlate-384, White # 6007290, PerkinElmer Inc. (Waltham, USA)

Zellkultur Microplatte #650180, Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Dtl.)

Nunc MaxiSorp™ flat-bottom #44-2404-21, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Amicon Ultra-0.5mL Centrifugal Filters #UFC500324, Merck Millipore (Billerica, USA)

Reaction chamber chip Fluidic 560 #12-1408-0560-03, microfluidic ChipShop GmbH (Jena, Dtl.)

Handling frame with high skirt #15-4001-0000-12, microfluidic ChipShop GmbH (Jena, Dtl.)

Eppendorf PCR Film #0030127781, Eppendorf AG (Hamburg, Dtl.)

mcs-foil 008 #09800000, microfluidic ChipShop GmbH (Jena, Dtl.)

3.5 Geräte

Mikroplattenleser SPARCL und ELISA: **Mithras LB940**, Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, Dtl.)

Plattformschüttler: **Titramax 100**, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Dtl.)

Vortex-Schüttler: **VVR3**, VWR International GmbH (Radnor, USA)

Tischzentrifuge: **Rotilabo®-Mini-Zentrifuge**, Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Dtl.)

Kühl-Thermomixer: **MKR 13**, HLC BioTech (Göttingen, Dtl.)

Mikroplattenleser AlphaLISA: **Infinite® M1000 PRO**, Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)

Zentrifuge: **MIKRO 200 R**, Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Dtl.)

Plasmaanlage: **Zepto**, Diener electronic GmbH & Co. KG (Ebhausen, Dtl.)

Ofen: **Universal-Wärmeschrank 300**, Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach, Dtl.)

Pumpe: **312 ST AC 230V 230** #3120005, Gardner Denver Inc. (Milwaukee, USA)

3.6 Software

Mikro Win 2000, Mikrotek Laborsysteme GmbH (Overath, Dtl.)

4 Methoden

Der Analyt TIMP-1 aus dem DuoSet-Kit von R&D Systems wurde in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf eine Konzentration von 70 ng/ml verdünnt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Alle Verdünnungsschritte des Analyten erfolgten mit PBS. Alle Reagenzien außer das Enzym Meerrettich-Peroxidase wurden vor jeder Verwendung gründlich gevortext. Angefangene Aliquote aus dem -80°C-Tiefkühlschrank wurden bei -22°C gelagert. Andere Puffer und Reagenzien wurden bei 4°C gelagert. Als Negativkontrolle dienten Ansätze mit PBS ohne TIMP-1. Inkubationsschritte erfolgten in der Regel bei 750 rpm und RT auf dem Plattformschüttler.

4.1 Untersuchungen zur Eignung homogener Immunoassays

Beide Assays wurden in einer OptiPlate-384 durchgeführt. Die Signalstärke wurde in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen. Für die Auswertung wurde zunächst die maximale Signalstärke (MAX RLU) ermittelt. Danach wurde für jede Analyt-Konzentration der Mittelwert aus allen Ansätzen gebildet und die Standardabweichung berechnet. Dann wurde die Signalstärke S einer Konzentration durch die Signalstärke S₀ der Negativkontrolle dividiert, der Quotient wurde als S/S₀ bezeichnet.

4.1.1 Durchführung eines SPARCLs

Für den Nachweis von TIMP-1 wurde mit dem Fänger-Antikörper (Cap-Ab, von engl.: Capture Antibody) und dem Detektions-Antikörper (Det-Ab, von engl.: Detection Antibody) aus dem DuoSet-Kit gearbeitet. Der Assay wurde nach dem Protokoll für das Lumigen SPARCL™ Detection Kit (Lumigen, o. J.) durchgeführt.

Der Cap-Ab wurde vorbereitend mit Acridan markiert. Hierfür wurde das SPARCL-Kit verwendet. Als erstes wurden 500 µl Dimethylformamid (DMF) zu 0,5 mg des SPARCL Labeling Reagent gegeben. In einem weiteren Mikroreaktionsgefäß (RG) wurden 708,7 µl des BupH Borate Buffer Pack mit 41,3 µl der Labeling Reagent in DMF und 250 µl des Cap-Ab [1 mg/ml] gemischt. Das RG wurde fünfmal invertiert, mit Aluminiumfolie vor Lichteinstrahlung geschützt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Antikörper über Nacht bei 4°C im Kühl-Thermomixer

weiter inkubiert. Der entstandene Acridan-markierte Antikörper [250 µg/ml], im Folgenden als Acr-Ab bezeichnet, wurde 1:9 in PBS verdünnt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

Der Det-Ab wurde in PBS/BSA auf eine Konzentration von 2.5 µg/ml verdünnt, ebenfalls aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Die Streptavidin-markierte Meerrettich-Peroxidase (SA-HRP) hatte eine Konzentration von 1000 ng/µl und wurde bei 4°C gelagert.

Die Durchführung eines SPARCLs ist in Abbildung 7 dargestellt. Zuerst wurde der Det-Ab vorbereitet. Für die Markierung wurde eine HRP-Lösung von 1 ng/µl benötigt. Hierfür wurde die Stammlösung 1:1000 in PBS/BSA verdünnt. Der Det-Ab wurde aufgetaut und in PBS/BSA auf eine Konzentration von 0.1 ng/µl verdünnt. Danach wurden der Antikörper und HRP in einem molaren Verhältnis von 1:1 (0.61 ng HRP auf 1 ng Det-Ab) in PBS/BSA für 15 min auf dem Kühl-Thermomixer bei 750 rpm und RT inkubiert. Der Acr-Ab wurde ebenfalls aufgetaut und in PBS von einer 25 ng/µl-Stammlösung auf eine Konzentration von 2 ng/µl verdünnt. Der Acr-Ab und der HRP-Ab wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und in jede benötigte Kavität 20 µl des Antikörper-Gemischs pipettiert. Danach wurde zu jeder Kavität 10 µl TIMP-1 pipettiert und der Assay 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde zu jeder Kavität 4 µl verdünnte *background-reducing agent*, kurz dBGR, gegeben und der Assay im *Mithras* analysiert. Hierfür injizierte der Mikroplattenleser nacheinander in jede Kavität 30 µl des selbst hergestellten Triggers (SMT) und die Lumineszenz wurde für 10 s alle 0.05 s gemessen.

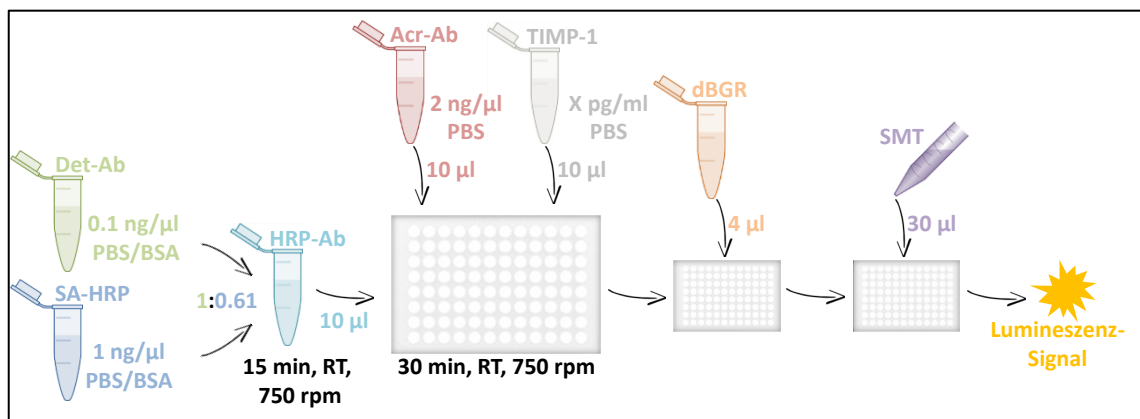


Abbildung 7 Durchführung eines SPARCLs

4.1.2 Durchführung eines AlphaLISAs

Für den AlphaLISA wurden Beads und Antikörper aus dem TIMP-1-Kit von PerkinElmer verwendet. Das Kit wurde bei 4°C gelagert.

Der AlphaLISA wurde nach dem AlphaLISA-Protokoll von PerkinElmer [URL-11] mit drei Inkubationsschritten durchgeführt (Abbildung 8). Das Kit wurde bei 4°C aufbewahrt. Zur Vorbereitung wurde der 10-fach AlphaLISA Immunoassay Puffer 1:10 in destilliertem Wasser (dH₂O) verdünnt. Alle nachfolgenden Verdünnungsschritte erfolgten mit diesem Puffer. Als erstes wurden die Akzeptor-Beads [5 mg/ml] 1:100 auf eine Konzentration von 50 µg/ml verdünnt und 10 µl der Beads mit 5 µl des Analyten für 30 min inkubiert. Währenddessen wurde die Biotin-Antikörper-Stammlösung [500 nmol/l] ebenfalls 1:100 auf eine Konzentration von 5 nmol/l verdünnt. Der Assay wurde nach Zugabe der Biotin-Antikörper für 60 min inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Donator-Beads [5 mg/ml] 1:62.5 auf eine Konzentration von 80 µg/ml verdünnt und 25 µl der Lösung in jede Kavität gegeben. Der letzte Inkubationsschritt von 30 min erfolgte lichtgeschützt. Die Lumineszenz wurde im Mikroplattenleser *Infinite M 1000 Pro* detektiert. Der Assay wurde für 200 ms bei einer Wellenlänge von 680 nm angeregt, die Emission wurde 500 ms bei 615 nm gemessen.

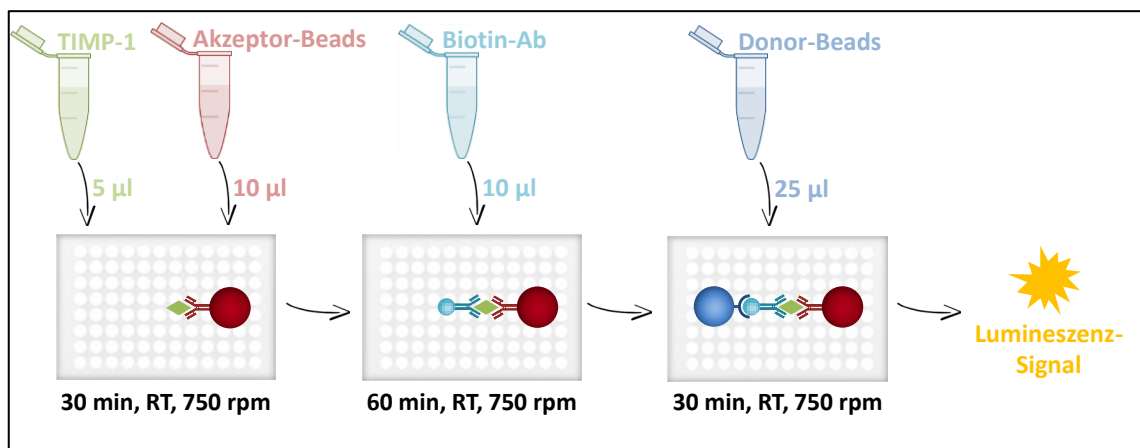


Abbildung 8 Durchführung eines AlphaLISAs

4.1.3 Erstellen einer Kalibrierkurve

Um die Empfindlichkeit der beiden homogenen Immunoassays zu ermitteln, wurde je eine Kalibrierkurve nach oben beschriebenen Protokollen aufgenommen. Es wurde mit den Konzentrationen 50'000, 10'000, 5'000, 2'500, 1'000, 500, 250, 100, 10 und 0 pg/ml TIMP-1 gearbeitet und bei beiden Assays für jede Konzentration ein Dreifach-Ansatz pipettiert.

Die Berechnung der Nachweisgrenze (LOD) und der Quantifizierungsgrenze (LOQ) erfolgte mithilfe nachfolgender Formeln.

Formel 1 Berechnung des LOD-Werts

$$\text{LOD} = \text{MW}(S_0) + 3 \times \text{StAbw}(S_0) \text{ in RLU}$$

Formel 2 Berechnung des LOQ-Werts

$$\text{LOQ} = \text{MW}(S_0) + 10 \times \text{StAbw}(S_0) \text{ in RLU}$$

Aus den Werten S/S₀ wurde für beide Assays ein Diagramm erstellt (Abbildung 14) und eine lineare Trendlinie mit einem Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0.99$ berechnet. Dafür wurde bei SPARCL der Bereich von 0-5000 pg/ml TIMP-1 gewählt, bei AlphaLISA die gesamte Kalibrierkurve von 0-50'000 pg/ml TIMP-1. Anhand der Formel für die jeweilige Trendlinie wurden die Konzentrationen an TIMP-1 für die Nachweis- und Quantifizierungsgrenze ermittelt.

4.1.4 Einfluss von Ascorbinsäure

Um den Einfluss von Ascorbinsäure auf die beiden homogenen Immunoassays zu untersuchen, wurden 100, 350 und 3000 mg/l Ascorbinsäure in dH₂O gelöst. Die Assays wurden nach oben beschriebenen Protokollen mit einer Konzentration von 1000 pg/ml TIMP-1 durchgeführt. Beim SPARCL wurde statt mit 10 µl TIMP-1 [1000 pg/ml] mit nur 5 µl TIMP-1 [2000 pg/ml] gearbeitet. Beim AlphaLISA wurden statt 25 µl Donator-Beads [80 µg/ml] nur 20 µl Donator-Beads [100 µg/ml] verwendet. Die fehlenden 5 µl wurden bei beiden Assays durch Ascorbinsäure oder dH₂O ergänzt. Als Kontrolle dienten Proben mit Wasser statt Ascorbinsäure (Tabelle 1).

Tabelle 1 Pipettierschema, Einfluss von Ascorbinsäure auf SPARCL und AlphaLISA

SPARCL				AlphaLISA			
AA 100	AA 350	AA 3000	K	AA 100	AA 350	AA 3000	K
AA 100	AA 350	AA 3000	K	AA 100	AA 350	AA 3000	K
AA 100 (-)	AA 350 (-)	AA 3000 (-)	K (-)	AA 100	AA 350	AA 3000	K
AA 100 (-)	AA 350 (-)	AA 3000 (-)	K (-)	AA 100 (-)	AA 350 (-)	AA 3000 (-)	K (-)
AA 100 (-)	AA 350 (-)	AA 3000 (-)	K (-)	AA 100 (-)	AA 350 (-)	AA 3000 (-)	K (-)

AA ... Ascorbinsäure
K ... Kontrollansatz mit dH₂O ohne AA
(-) ... Negativkontrolle mit PBS ohne TIMP-1

4.1.5 Aufkonzentrierung der Probe mit Zentrifugen-Filtereinheiten

Zur Aufkonzentrierung der Probe wurden Amicon® Zentrifugen-Filtereinheiten verwendet. Zuerst wurden die Filtereinheiten mit 500 µl dH₂O für 10 min bei 14'000 rpm in der Zentrifuge gewaschen. Danach wurden sie mit 50 µl TIMP-Lösung [2000 ng/ml], 400 µl PBS und 50 µl dH₂O oder Ascorbinsäure [6000 mg/l] befüllt. Die Lösung wurde 30 min bei 14'000 rpm zentrifugiert. Dann wurde der Durchfluss verworfen, die Säulen verkehrt herum zurück in das RG gestellt und das Retentat 1 min bei 14'000 rpm eluiert. Anschließend wurden je 10 µl des Retentats in eine Kavität gegeben und der SPARCL nach oben beschriebenem Protokoll durchgeführt. Als Kontrolle dienten eine nicht aufkonzentrierte Probe mit 50 µl TIMP-Lösung [2000 ng/ml] und 50 µl Ascorbinsäure [6000 mg/l], sowie eine nicht aufkonzentrierte Probe mit 50 µl TIMP-Lösung [2000 ng/ml] und 50 µl dH₂O (Tabelle 2). Die Negativkontrollen wurden nicht aufkonzentriert.

Tabelle 2 Pipettierschema, Aufkonzentrierung der Proben

Aufkonzentriert		Nicht aufkonzentriert		(-)	(-)
50 µl TIMP-1	50 µl TIMP-1	50 µl TIMP-1	50 µl TIMP-1	50 µl PBS	50 µl PBS
50 µl dH ₂ O	50 µl AA	50 µl dH ₂ O	50 µl AA	50 µl dH ₂ O	50 µl dH ₂ O

4.2 Immobilisierungsstrategien für heterogene Immunoassays

Als heterogener Immunoassay wurde ein klassischer ELISA nach dem Protokoll des DuoSet-Kits [URL-12] durchgeführt. Die Assays wurden in einer 96-well Zellkultur-Mikrotiterplatte angesetzt. Zur Markierung wurde eine poly-Meerrettich-Peroxidase (Poly-HRP) verwendet. Die Stocklösung hatte eine Konzentration von 1000 ng/ μ l und wurde bei -22°C aufbewahrt. Der Cap-Ab wurde in PBS auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Der Det-Ab wurde in PBS/BSA auf eine Konzentration von 25 μ g/ml verdünnt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Gewaschen wurden alle Kavitäten immer drei Mal mit je 300 μ l PBS mit 0.05 % (v/v) Tween-20 (PBST). Für alle Immobilisierungsstrategien wurde ein Zweifach-Ansatz mit den TIMP-1-Konzentrationen 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 und 0 pg/ml pipettiert.

4.2.1 Durchführung eines ELISA

Für den ELISA (Abbildung 9) wurden 100 μ l Cap-Ab nach dem Protokoll aus den Kapiteln 4.2.2 bis 4.2.4 auf der Platte inkubiert. Dann wurden die Kavitäten gewaschen und für 1 h mit PBS/BSA abgeblockt. Danach wurde erneut gewaschen. 100 μ l TIMP-1 wurde für 1 h inkubiert, die Kavitäten gewaschen und 100 μ l des in PBS/BSA auf 50 ng/ml verdünnten Det-Ab für 1h inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden je 100 μ l Poly-HRP [1 ng/ μ l] in PBS/BSA hinzugegeben und für 20 min lichtgeschützt inkubiert. In dieser Zeit wurde das 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrat, kurz TMB-Substrat, vorbereitet. Es sollte darauf geachtet werden, dass der Acetat-Puffer annähernd Zimmertemperatur hatte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein letztes Mal gewaschen und 100 μ l TMB-Substrat hinzugegeben. Nach 20 min wurde die Farbreaktion mit 50 μ l 2M Schwefelsäure unterbrochen, die Platte leicht geschwenkt und die Absorption danach bei einer Wellenlänge von 450 nm für 0.1 s im Mikroplattenleser *Mithras* gemessen.

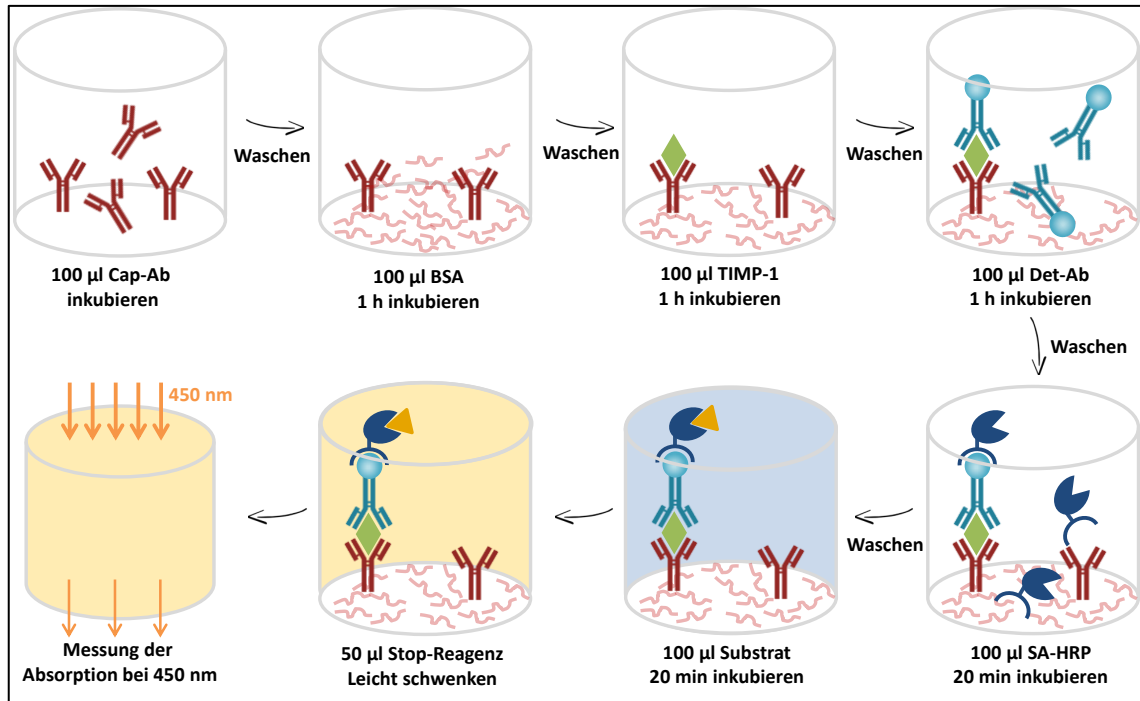


Abbildung 9 Durchführung eines ELISAs

4.2.2 Immobilisierung durch Adsorption

Für die Immobilisierung durch Adsorption wurde der Cap-Ab in PBS auf eine Konzentration von 2 µg/ml verdünnt und 100 µl pro Kavität pipettiert. Der Cap-Ab wurde über Nacht inkubiert und danach der ELISA nach oben beschriebenem Protokoll durchgeführt.

Der gleiche Versuch wurde auf einer Nunc-Platte und auf einer aktivierten Zellkulturplatte wiederholt. Für die Adsorption auf der Nunc-Platte wurden nur die Konzentration 2500, 250, 25 und 0 pg/ml TIMP-1 gewählt. Für die Oberflächenaktivierung der Zellkulturplatte wurde die Plasmaanlage *Zepto* verwendet. Die Zellkulturplatte wurde in die Kammer der Plasmaanlage gestellt und diese dann dreimal im Abstand von je 2 min gründlich mit Sauerstoff geflutet. Danach wurde die Mikrotiterplatte 3 min lang mit Sauerstoffplasma behandelt.

4.2.3 Immobilisierung mit APTES

Die Immobilisierung mit APTES erfolgte in drei Schritten und wurde in Abbildung 10 schematisch dargestellt. Für die Oberflächenaktivierung (1) und die Antikörperimmobilisierung (3) wurde nach einem Protokoll von Dixit (2011) gearbeitet. Für die Silanisierung (2) wurde ein Protokoll von Kaur (2007) verwendet.

Zunächst wurden die Kavitäten mit 100 µl reinem Ethanol für 5 min behandelt. Danach wurde mit 300 µl dH₂O fünfmal gewaschen. Nach der Behandlung mit 100 µl Kaliumhydroxid-Lösung (1 % w/v in dH₂O) für 10 min wurde erneut fünfmal mit je 300 µl dH₂O gewaschen und die Mikrotiterplatte 3 min lang mit Sauerstoffplasma behandelt. Zuvor wurde die Kammer dreimal im Abstand von je 2 min gründlich mit Sauerstoff geflutet.

Zur Silanisierung der Platte wurden 2 % (v/v) 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) in dH₂O gelöst und jede Kavität mit 100 µl der APTES-Verdünnung 2 h bei RT und weitere 2 h bei 65°C im Ofen behandelt. Nach der Oberflächenaktivierung konnten die Platten über Nacht bei 4°C gelagert werden.

Für die Immobilisierung des Cap-Ab wurde zunächst eine Lösung aus 4 mg/ml 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) und 11 mg/ml N-Hydroxysulfosuccinimid (sulfo-NHS) in 25 mM MES-Puffer hergestellt. EDC-sulfo-NHS wurde im Verhältnis 1:100 mit Cap-Ab [2 µg/ml] in PBS und 25 mM MES-Puffer gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden je 100 µl der Lösung in die Kavitäten gegeben, für 1 h inkubiert und danach fünfmal mit 300 µl PBS gewaschen. Die weitere Vorgehensweise ab dem Blocken mit BSA entsprach dem Protokoll eines normalen ELISAs.

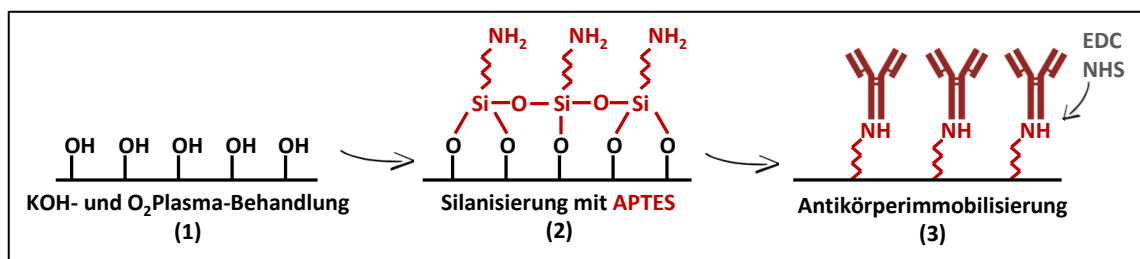


Abbildung 10 Immobilisierung mit APTES

4.2.4 Immobilisierung mit CMD

Für die Immobilisierung mit Carboxymethyl-dextran (CMD, Abbildung 11) wurde zuerst die Oberfläche wie bei der Immobilisierung mit APTES aktiviert. Danach wurde in jeder Kavität ein Gemisch aus CMD [2 mg/ml] in dH₂O, EDC [11.5 mg/ml] in 25 mM MES und sulfo-NHS [76.7 mg/ml] in 25 mM MES im Verhältnis 6:1:1 für 30 min auf der Platte inkubiert. Dann wurde dreimal mit 300 µl PBS und anschließend dreimal mit 300 µl dH₂O gewaschen. Nach diesem Schritt konnte die Platte über Nacht bei 4°C gelagert werden. Im Anschluss wurden die Kavitäten 5 min lang mit je 100 µl

eines EDC-sulfo-NHS-Gemischs (1:1) oben genannter Konzentrationen behandelt. Nach einmaligem Waschen mit 300 μl dH_2O wurden 100 μl des Cap-Ab [2 $\mu\text{g}/\text{ml}$] in PBS für 1 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde dreimal mit je 300 μl PBST gewaschen und die Kavitäten danach mit 100 μl 1 M TRIS-Puffer für 10 min abgesättigt. Danach wurde erneut dreimal mit 300 μl PBST gewaschen. Durch das Absättigen mit TRIS-Puffer entfiel das Abblocken mit PBS/BSA und es konnte direkt der Analyt pipettiert werden. Hierfür und für alle weiteren Schritte wurde nach dem ELISA-Protokoll vorgegangen.

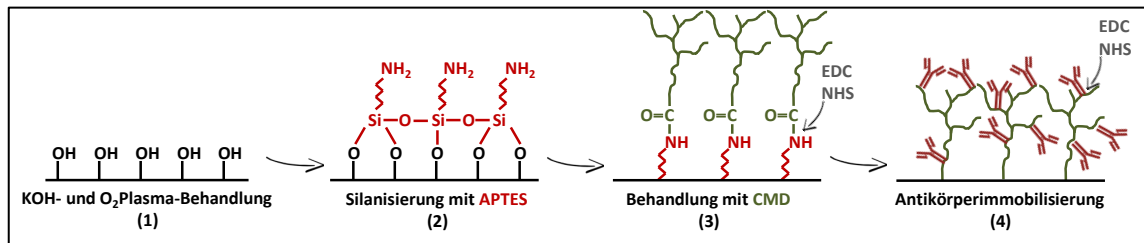


Abbildung 11 Immobilisierung mit CMD

4.2.5 Optimierung der Immobilisierung mit Carboxymethyldextran

Um die Immobilisierung mit CMD zu optimieren, wurden einige Änderungen am Protokoll vorgenommen. Unter anderem wurden Anpassungen am pH-Wert und der Konzentration an CMD, EDC und sulfo-NHS vorgenommen. Um die Auswirkungen dieser Änderungen zeit- und reagenziensparend feststellen zu können, wurde mit einem Modell-Bindungspartner gearbeitet. Hierbei handelte es sich um ein 21 bp langes Oligonukleotid mit einer Aminogruppe an einem und Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC) als Marker am anderen Ende. Das Oligonukleotid wurde mit einer 5 μM Konzentration anstelle von 100 μl Cap-Ab pipettiert. Das Fluorescein wurde bei 485 nm angeregt, die Emission bei 535 nm gemessen. Dabei wurde angenommen, dass die Stärke des Fluoreszenzsignals direkt proportional zur Anzahl der an CMD gebundenen Aminogruppen ist. Folgende Strategien wurden mit dem FITC-Oligonukleotid untersucht.

Strategie 1:

- CMD-Beschichtung wie oben beschrieben
- EDC [76.7 mg/ml], sulfo-NHS [11.5 mg/ml]

Strategie 2:

- Geringere Mengen an EDC und sulfo-NHS bei gleichbleibender Menge an CMD

Strategie 3:

Aktivierung nur mit EDC (ohne sulfo-NHS)

Strategie 4:

Inkubation von FITC und CMD im gleichen Schritt

Kontrolle 1 (100 % Fluoreszenz):

50 µl Oligonukleotid [10 µM], 40 µl CMD [4.5 mg/ml], 30 µl 100 mM MES

Kontrolle 2 (unspezifische Bindungen):

50 µl Oligonukleotid [10 µM], 40 µl CMD [4.5 mg/ml], 30 µl 100 mM MES

Kavität drei Mal mit je 300 µl PBST waschen

Kontrolle 3 (0 % Fluoreszenz):

Leere Kavität

Danach wurde die Strategie 1 noch einmal angepasst. Dafür wurden die Konzentration an EDC, sulfo-NHS und CMD erhöht. Es wurde ein Gemisch aus CMD [10 mg/ml] in PBS, EDC [153.4 mg/ml] in 100 mM MES und sulfo-NHS [23 mg/ml] in 100 mM MES in einem Verhältnis von 6:1:1 für 10 min in einem RG inkubiert. Danach wurden in jeder Kavität zu 100 µl des Gemischs 0, 17.5 oder 35 µl Boratpuffer hinzugegeben und der Test dann wie oben beschrieben durchgeführt. Außerdem wurde bei der Silanisierung der Oberfläche APTES in Ethanol gelöst. Die Kontrolle 1 bestand aus 100 µl Oligonukleotid [5 µM] in PBS, Kontrolle 2 wie Kontrolle 1 und drei Mal mit je 300 µl PBST gewaschen und Kontrolle 3 wieder eine leere Kavität.

Diese Strategie wurde mit einem ELISA wiederholt. Allerdings wurde keine pH-Anpassung vorgenommen.

4.3 Übertragen des Immunoassays auf einen Mikrochip

Als Mikrochip wurde der hydrophilisierte Reaktionskammer-Chip 560 aus Polycarbonat (PC) oder Polystyrol (PS) der microfluidic ChipShop GmbH in Jena gewählt. Der Chip besteht aus vier Reaktionskammern, die Maße sind in Abbildung 12 dargestellt. Der PC-Chip wurde mit einem PCR-Film von Eppendorf gedeckelt, die Kanäle hatten ein Volumen von 50 µl. Für den PS-Chip wurden eine doppelseitige Klebefolie (mcs-foil 008) und eine klebefreie Deckfolie des ChipShops verwendet. Durch das Aufbringen der Klebefolie hatten die Kanäle ein Volumen von circa 75 µl. Je nach Art

des verwendeten Chips wurden deshalb 50 oder 75 μl einer Reagenz in den Kanal pipettiert.

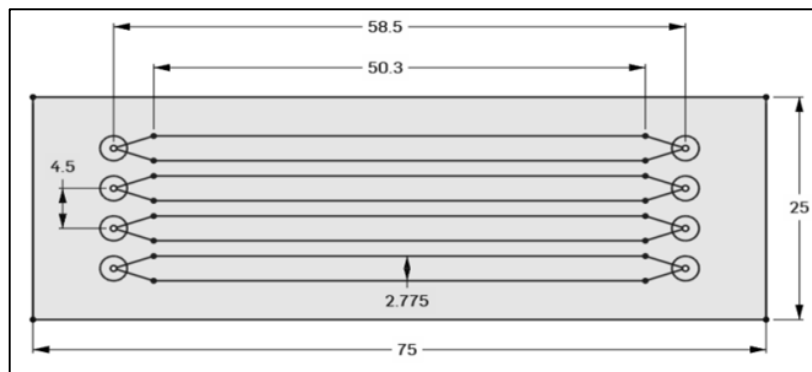


Abbildung 12 Maße des verwendeten Mikrochips

Für die Aufnahme einer Kalibrierkurve wurden die Analyt-Konzentrationen 5000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 und 0 pg/ml TIMP-1 gewählt. Auf dem PC-Chip wurde die Kalibrierkurve im Sechsfachansatz aufgenommen. Da sich der PS-Chip als ungeeignet erwies, wurde die Kalibrierkurve auf diesem Chip nur drei Mal wiederholt.

Als Referenz wurde der ELISA im Fünffachansatz auf einer Nunc-Platte durchgeführt. Das Vorgehen entsprach dem in Kapitel 4.2.1 *Durchführung eines ELISA* beschriebenen Verfahren mit Immobilisierung des Cap-Ab durch Adsorption. Allerdings wurde mit 3 % BSA in PBS abgeblockt, die TIMP-Verdünnungen in PBS/BSA vorgenommen und der Det-Ab in einer Verdünnung von 33 ng/ml verwendet.

4.3.1 Durchführung eines ELISA auf dem Chip

Auf dem Chip wurde ein ELISA mit Immobilisierung des Cap-Ab durch Adsorption durchgeführt. Alle Reagenzien wurden per Hand in den Chip pipettiert. Zum Waschen wurde mit Hilfe einer Pipette und einer Vakuumpumpe je 2 ml PBST durch den Kanal gesaugt. Die Inkubation erfolgte, soweit nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur.

Zunächst wurden 50 (75) μl Cap-Ab [2 $\mu\text{g/ml}$] in PBS über Nacht bei 4°C im Kanal immobilisiert. Danach wurde der Kanal gewaschen und die Oberfläche für eine Stunde mit 50 (75) μl PBS mit 3 % BSA (w/v) abgeblockt. Nach erneutem Waschen wurden die Analyt-Verdünnungen in PBS/BSA hergestellt und je 50 (75) μl Analyt-Lösung für 1 h im Kanal inkubiert. Der Det-Ab wurde in PBS/BSA auf eine Konzentration von 33 ng/ml verdünnt und nach dem Waschen 50 (75) μl für 1 h im Kanal inkubiert. Der Kanal wurde erneut gewaschen. Anschließend wurden 50 (75) μl Poly-HRP [1 $\text{ng}/\mu\text{l}$] in

PBS/BSA für 20 min im Kanal inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden 50 (75) μl des TMB-Substrats von Thermo Fisher in den Kanal pipettiert.

4.3.2 Detektion des Farbumschlags

Für die Messung des Farbumschlags wurde ein Rahmen des ChipShops in Jena verwendet und der entsprechende Bereich einer 1536-well Mikrotiterplatte ausgelesen (siehe Anhang: Abbildung 24).

Der Chip wurde nach Zugabe des Substrats direkt in den Mikroplattenleser *Mithras* überführt um die Absorptionskinetik über fünf Minuten zu messen. Das verwendete Programm war *MikroWin 2000* und es wurde der Modus "Absorbance Repeated" gewählt. Die genauen Parameter sind in Abbildung 25 Parameter für "Absorbance Repeated" im Anhang aufgelistet. Nach erfolgter Messung wurde der Chip wieder entnommen und die Reaktion mit 10 μl einer 2 M Schwefelsäure gestoppt. Die gesamten 60 (85) μl Flüssigkeit im Kanal wurden mit einer Pipettenspitze aufgezogen und zurück in den Kanal pipettiert. Danach konnte mit dem Mikroplattenleser die Absorption im Chip für 0.1 s bei 450 nm gemessen werden.

4.3.3 Auswertung der Messergebnisse

Die Auswertung der Messergebnisse ist schematisch in Abbildung 13 dargestellt. Für die Absorption bei 450 nm, als A_{450} bezeichnet, wurde jeweils der Mittelwert aus den Daten aller fünf gemessenen Kavitäten gebildet (2).

Danach wurde im Programm *MikroWin 2000* mithilfe der Datei zur Absorptionskinetik der maximale Anstieg der aufgenommenen Kurven über die ersten zehn Datenpunkte berechnet. Aus allen fünf Anstiegen einer Konzentration konnte der Mittelwert berechnet werden. Dieser Wert wurde als V_{MAX} bezeichnet (3).

Für den Konzentrationsbereich 0 bis 1000 pg/ml TIMP-1 wurde sowohl für V_{MAX} als auch für A_{450} eine lineare Trendlinie berechnet. Beide Parameter wurden mit zugehörigen Standardabweichungen in einem Diagramm aufgetragen (4).

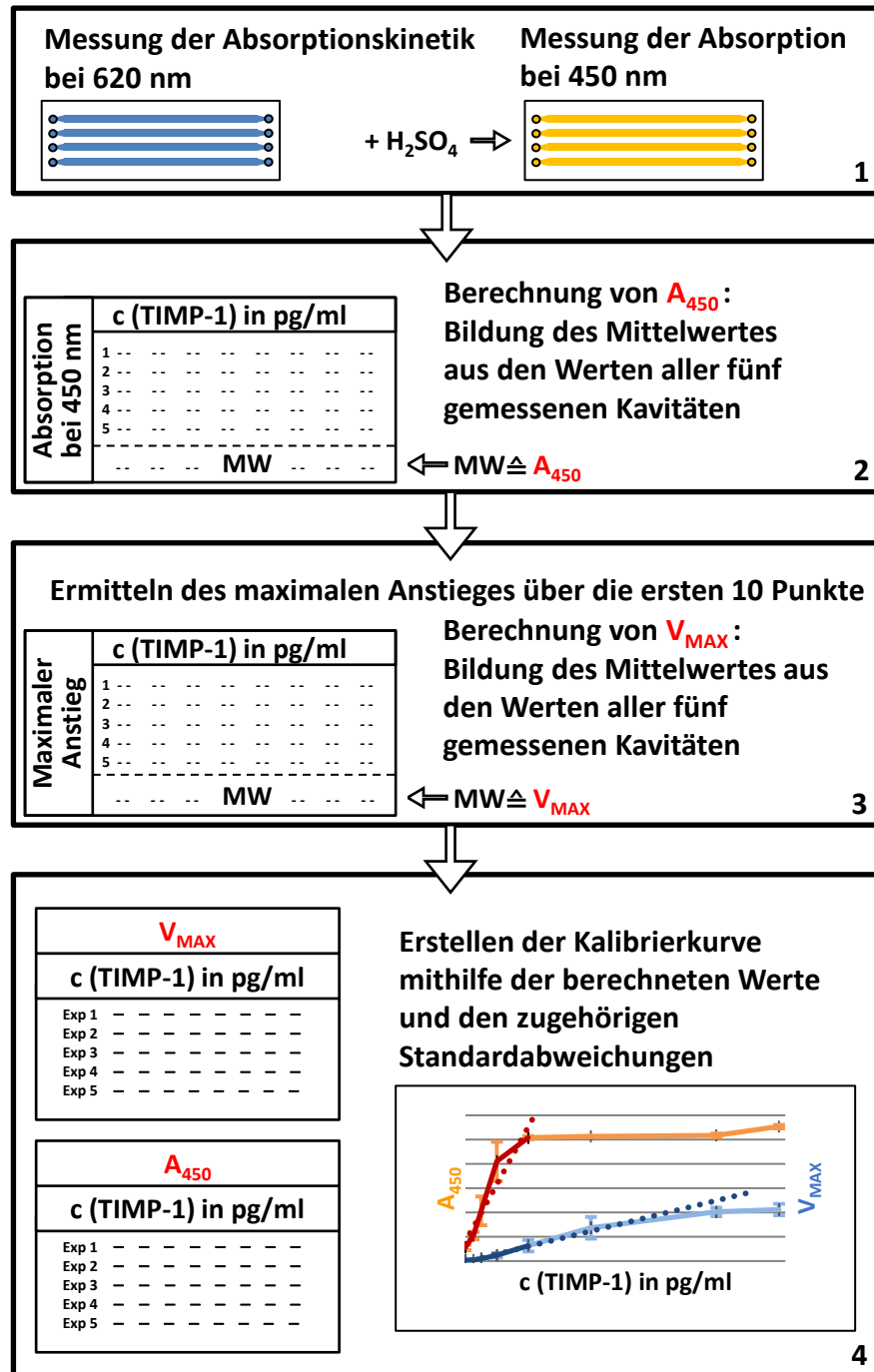


Abbildung 13 Auswertung der Messung

4.3.4 Reproduzierbarkeit des Assays auf dem Chip

Um die Reproduzierbarkeit des Assays auf dem Chip zu überprüfen, wurde der ELISA, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, auf dem PC-Chip mit PCR-Film durchgeführt. Es wurden je drei Kanäle mit den Analyt-Konzentrationen 5000, 1000, 500, 250 und 0 pg/ml TIMP-1 inkubiert. Die ermittelten Werte wurden mit den entsprechenden Werten der auf dem PC-Chip aufgenommenen Kalibrierkurve verglichen.

5 Ergebnisse

5.1 Eignung homogener Immunoassays

5.1.1 Erstellen einer Kalibrierkurve

Die Empfindlichkeit der beiden homogenen Immunoassays ist in Abbildung 14 grafisch dargestellt. Für den SPARCL wurde eine Nachweisgrenze von 178.3 pg/ml TIMP-1 ermittelt. Die Quantifizierungsgrenze liegt bei einer Konzentration von 193.6 pg/ml TIMP-1. Für den AlphaLISA liegt der LOD-Wert deutlich höher, bei 1298.9 pg/ml TIMP-1. Für den LOQ-Wert errechnet sich eine Konzentration von 1578.9 pg/ml

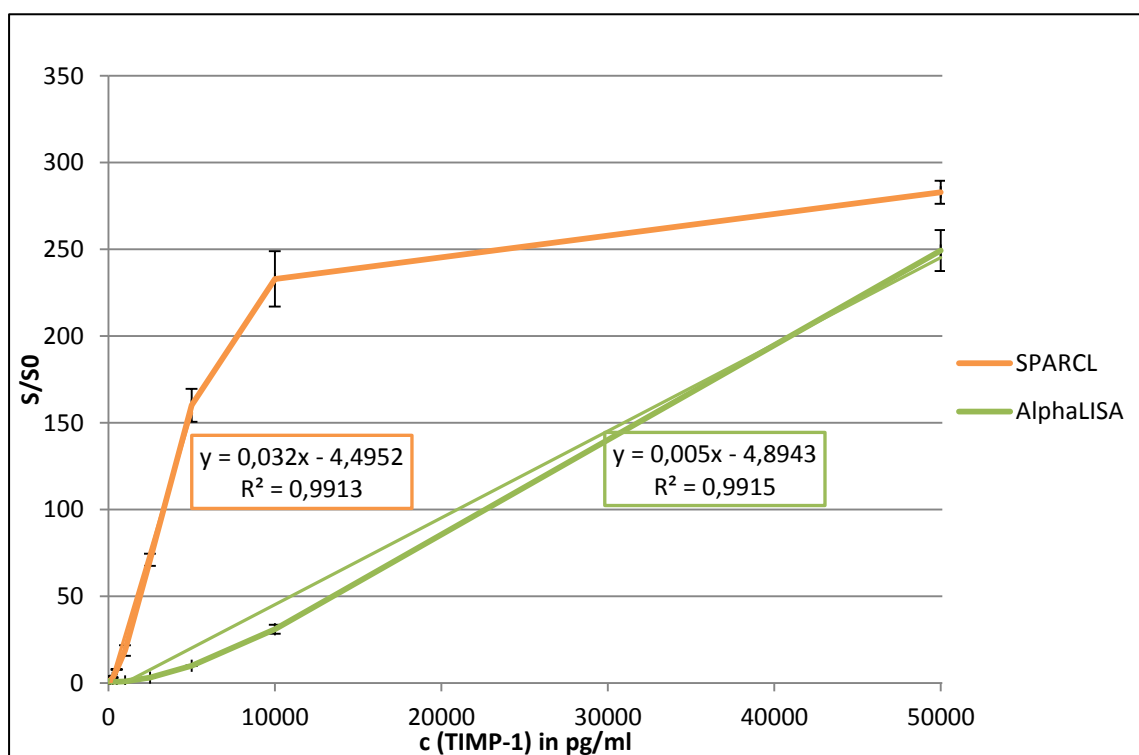


Abbildung 14 Empfindlichkeit von SPARCL und AlphaLISA

5.1.2 Einfluss von Ascorbinsäure

Es hat sich gezeigt, dass beim SPARCL die Signalstärke mit zunehmender Konzentration an Ascorbinsäure abnimmt (Abbildung 15). Auch auf den AlphaLISA hat die Ascorbinsäure einen Einfluss. Es ist jedoch nicht eindeutig zu erkennen, ob das Signal mit zunehmender Konzentration an Ascorbinsäure sinkt oder steigt.

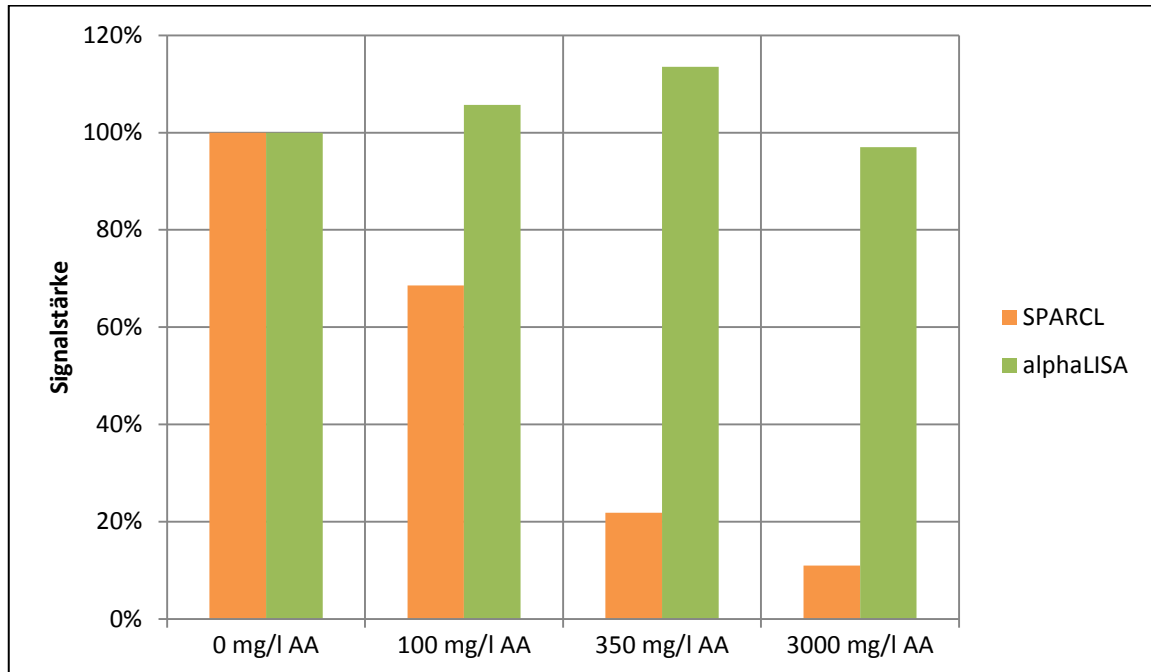


Abbildung 15 Signalabschwächung durch Ascorbinsäure bei SPARCL und AlphaLISA

5.1.3 Aufkonzentrierung der Proben mit Zentrifugen-Filtereinheiten

Die Werte in Abbildung 16 zeigen, dass mit den Zentrifugen-Filtereinheiten keine Aufkonzentrierung erfolgen konnte. Das Signal für die Referenzprobe ist 15-mal höher als das der aufkonzentrierten Probe. Allerdings ist zu erkennen, dass ein Teil der Ascorbinsäure bei der Zentrifugation entfernt wurde. Das Signal für die aufkonzentrierte Probe liegt sechsmal höher als das der Referenzprobe mit Ascorbinsäure. Anhand der vorliegenden Werte lässt sich nicht sagen, ob die Ascorbinsäure nur zu einem Teil oder vollständig entfernt wurde.

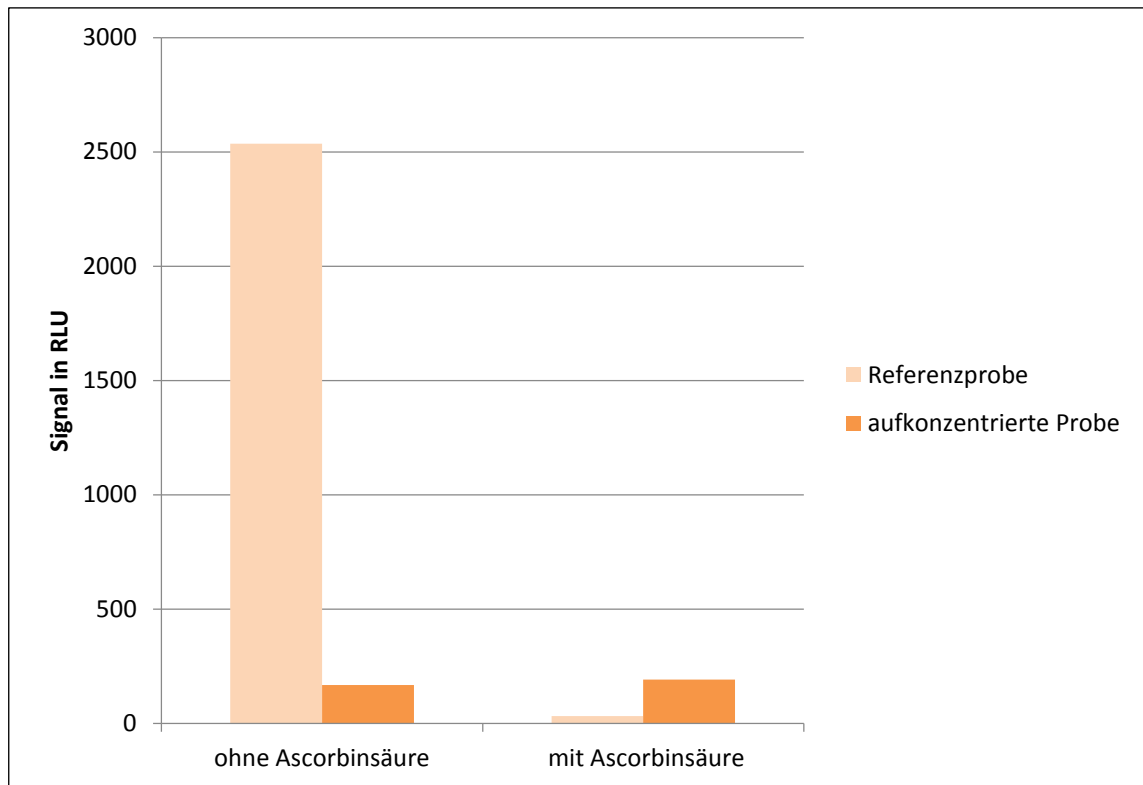


Abbildung 16 Aufkonzentrierung der TIMP-Probe mit Zentrifugen-Filtereinheiten

5.2 Immobilisierungsstrategien für heterogene Immunoassays

Die Adsorption auf der Nunc-Platte liefert die besten Ergebnisse. Bei einer Konzentration von 2000 pg/ml TIMP-1 liegt das Signal ungefähr bei 2.5 (siehe Abbildung 17). Im Vergleich dazu liegt der Wert für die Adsorption auf einer aktivierten Zellkultur-Platte nur bei 1 und der Wert für die Immobilisierung mit APTES bei 0.75. Für die Adsorption auf der Zellkulturplatte und für die Immobilisierung mit CMD unterscheiden sich die Signalstärken nur unwesentlich von den Werten für die Negativkontrollen.

Weiterhin ist zu erkennen, dass das Signal für die Negativkontrolle bei der Adsorption auf der Nunc-Platte fünf Mal höher ist als bei der Adsorption auf der Zellkulturplatte. Im Gegensatz dazu ist das Signal der Negativkontrolle bei der Immobilisierung mit CMD nur ungefähr halb so hoch wie bei der Adsorption auf der Zellkulturplatte.

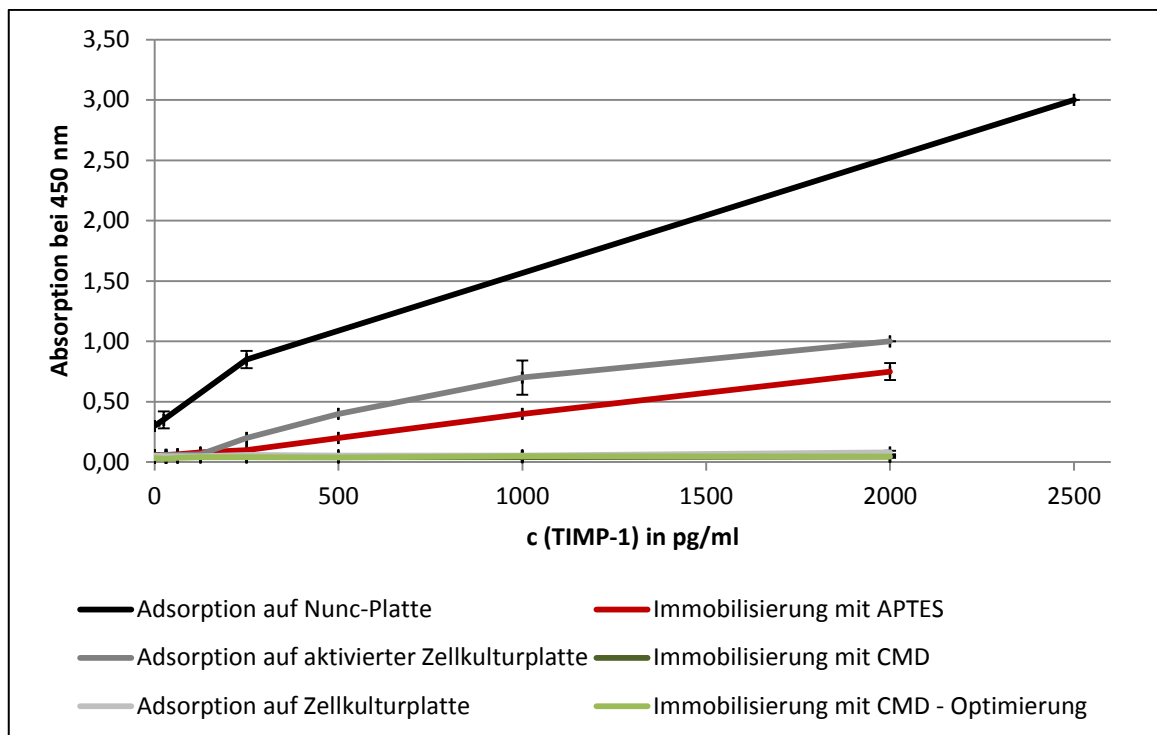


Abbildung 17 Vergleich der drei Immobilisierungsstrategien hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit

Die Optimierungsversuche (Abbildung 18) für die Immobilisierung mit CMD lieferten keine Erfolge. Das Signal war bei keiner der Strategien deutlich von der Negativkontrolle zu unterscheiden.

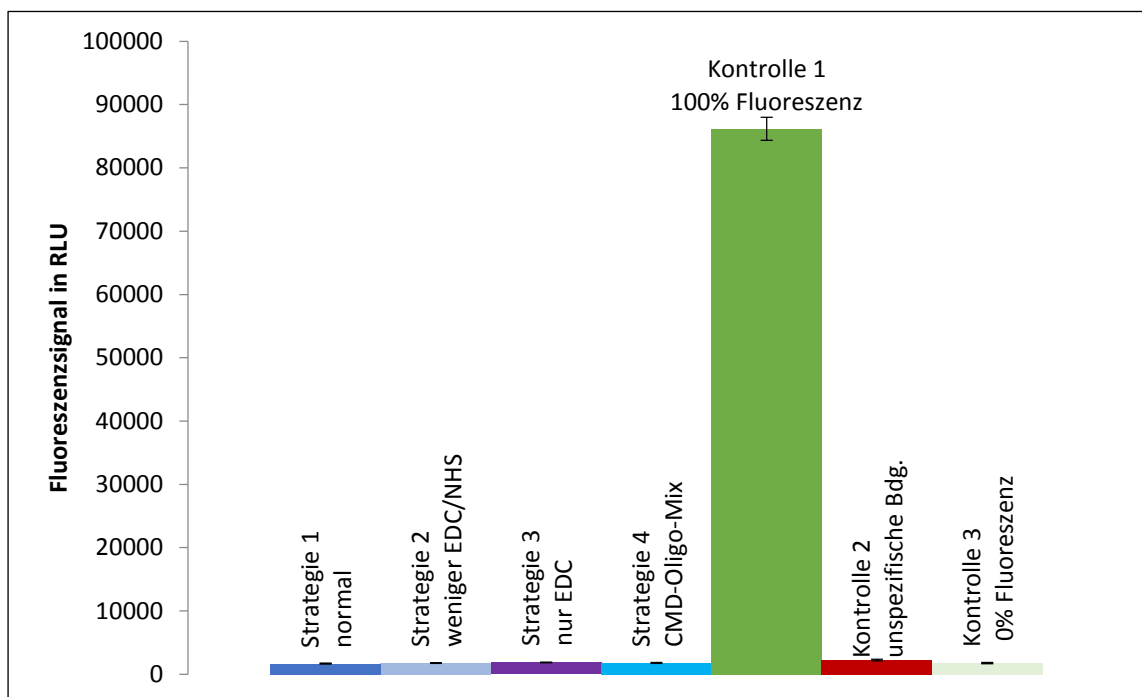


Abbildung 18 Optimierung der Immobilisierung mit CMD mithilfe eines FITC-markierten Oligonukleotids

Auch die pH-Anpassung (Abbildung 19) lieferte keine verbesserten Ergebnisse. Allerdings ist hier zu erkennen, dass alle Werte höher lagen als die der Negativkontrolle. Die Signalstärke für Kontrolle 2 (unspezifische Bindungen) ist jedoch wiederum höher als die der Proben.

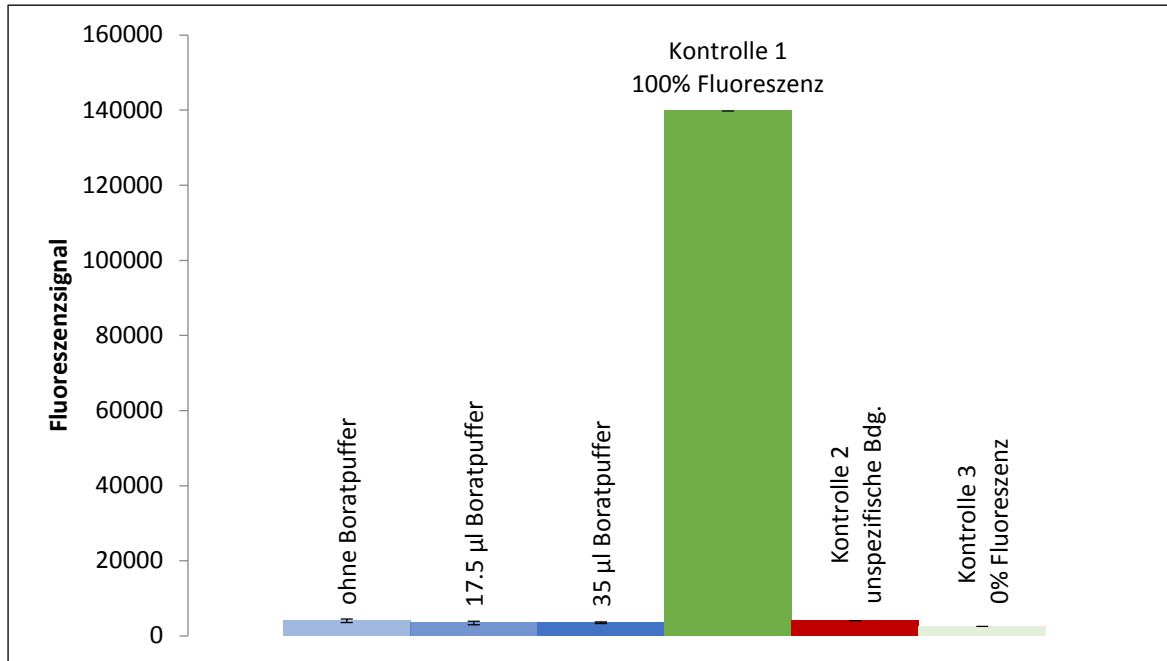


Abbildung 19 pH-Anpassung mit Borat-Puffer bei der Immobilisierung mit CMD

5.3 Übertragen des Assays auf einen Mikrochip

5.3.1 ELISA auf der Nunc-Platte

Die Absorption bei 450 nm (A_{450}) zeigt, dass bei etwa 1000 pg/ml TIMP-1 schon eine nahezu vollständige Absättigung der Kurve erreicht ist. Um die dynamische Spanne zu erhöhen, wurde deshalb über die Absorptionskinetik die Geschwindigkeit der Farbentwicklung (V_{MAX}) gemessen. Bis ca. 2000 pg/ml Analyt ist für V_{MAX} ein linearer Zusammenhang erkennbar. Danach flacht auch hier die Kurve etwas ab. Erst bei 4000 pg/ml TIMP-1 ist jedoch eine deutliche Absättigung zu erkennen (siehe Abbildung 20).

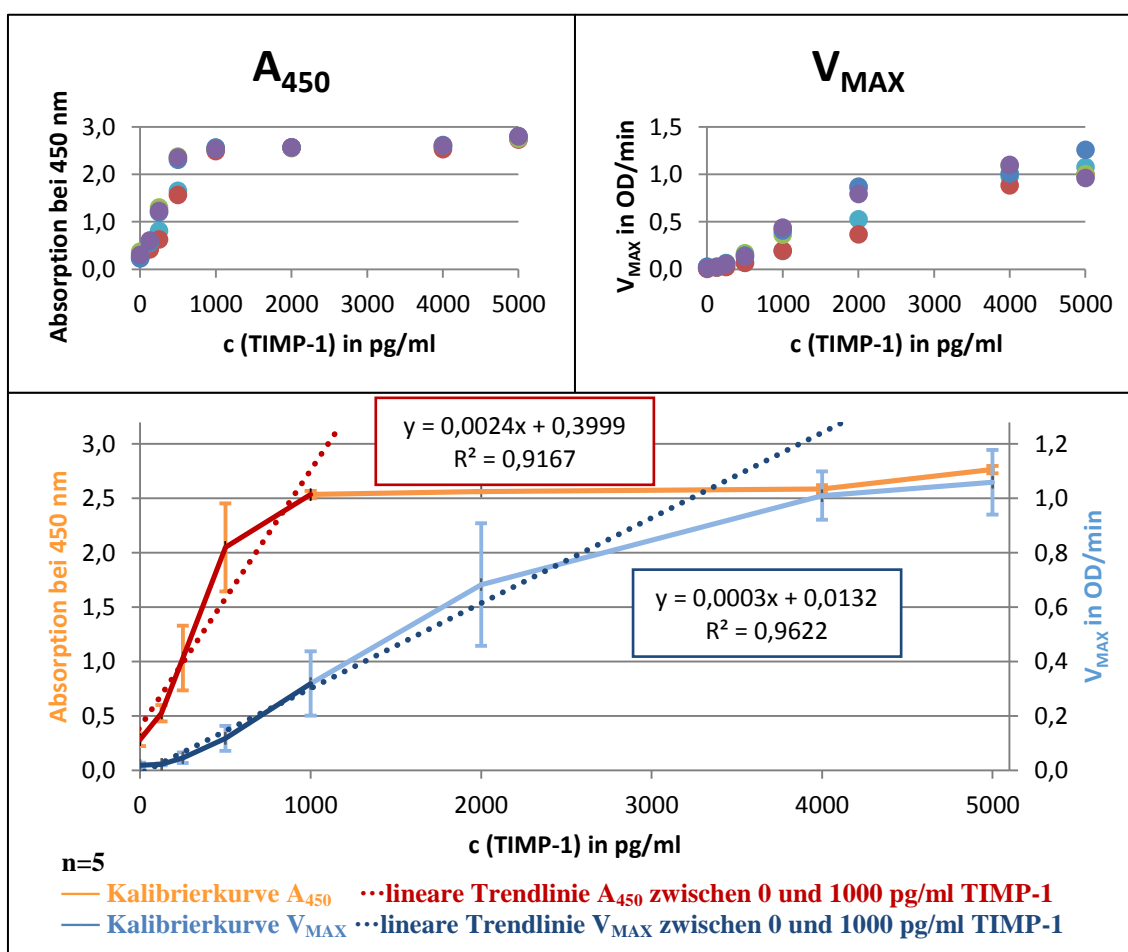


Abbildung 20 ELISA auf der Nunc-Platte

Werden beide Parameter verglichen, so ist gut zu erkennen, dass die Absorption bei 450 nm als Endpunktmethode bis circa 1000 pg/ml TIMP-1 mit einer Steigung von 0.0024 deutlich empfindlicher ist als die Absorptionskinetik mit einer Steigung von 0.0003. Je höher die Steigung ist, desto größer ist auch der Absorptionsunterschied zwischen zwei nahe beieinanderliegenden Analyt-Konzentrationen und desto

empfindlicher ist demzufolge die Detektionsmethode. Jedoch weist in diesem Bereich die Kalibrierkurve von A_{450} auch eine sehr hohe Standardabweichung bis zu 0.405 auf. Zudem ist das Bestimmtheitsmaß mit $R^2=0,9167$ bereits sehr gering. Das weist darauf hin, dass nicht bis 1000 pg/ml Analyt ein linearer Zusammenhang besteht. Die Absorptionskinetik zeigt hingegen erst ab 4000 pg/ml TIMP-1 ein deutliches Abflachen der Kurve.

5.3.2 ELISA auf dem PC-Chip

Auf dem PC-Chip (Abbildung 21) ähneln sich die Kurvenverläufe von A_{450} und V_{MAX} stark. Im niedrigen Konzentrationsbereich bis 1000 pg/ml TIMP-1 erweist sich die Absorption bei 450 nm als geringfügig empfindlicher. Die Steigung der Trendlinie beträgt hier 2×10^{-4} , bei der Absorptionskinetik beträgt die Steigung der Trendlinie hingegen nur 2×10^{-5} . Der Unterschied zwischen beiden Detektionsmethoden ist jedoch deutlich geringer als auf der Nunc-Platte. Über den gesamten Kurvenverlauf ist die Standardabweichung von V_{MAX} deutlich höher als die von A_{450} . Besonders starke Schwankungen zwischen den Messwerten zeigen sich hier bei 4000 pg/ml TIMP-1.

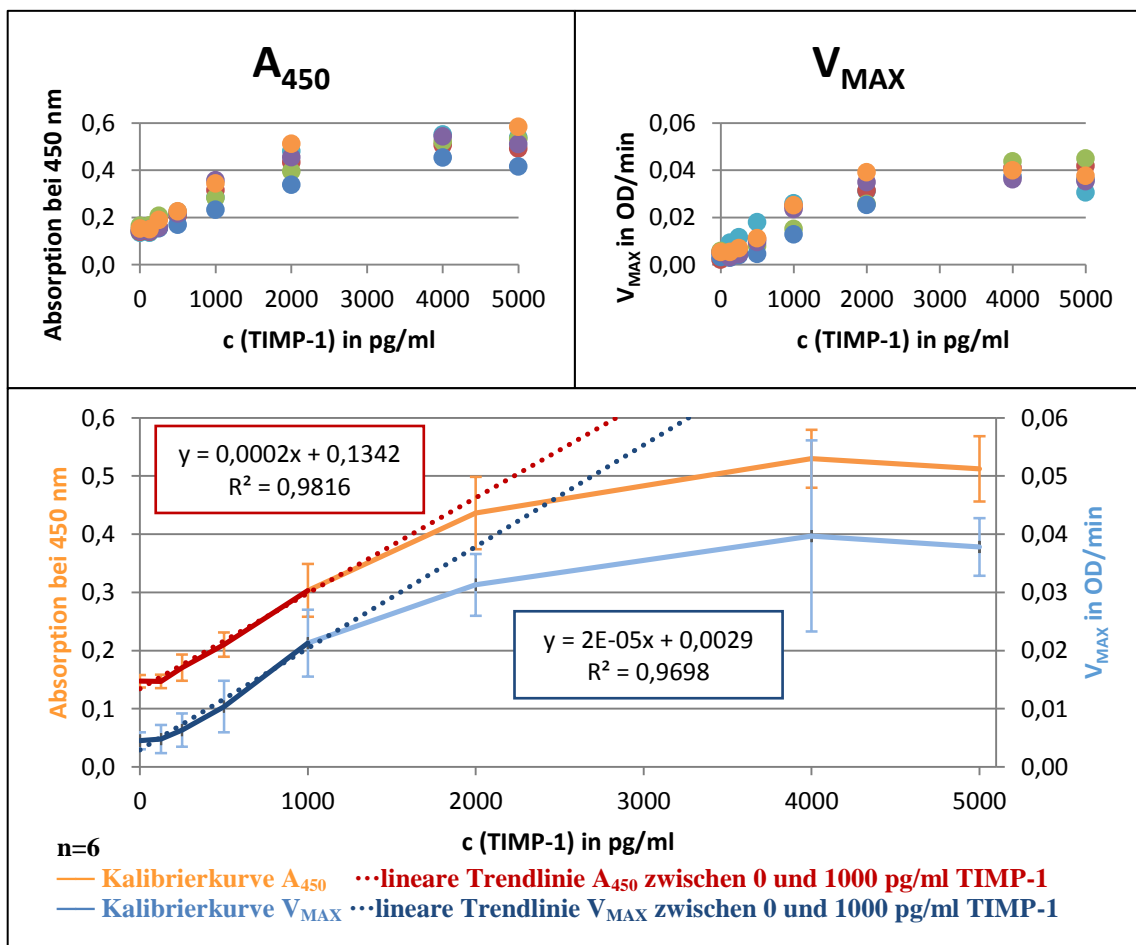


Abbildung 21 ELISA auf dem PC-Chip

5.3.3 ELISA auf dem PS-Chip

Auf dem PS-Chip zeigt sich in den Kanälen eine unterschiedlich starke Farbentwicklung nach Zugabe des Substrats (siehe Abbildung 22). Die Kanäle sind besonders an den Rändern stark blau, während andere Stellen nahezu transparent sind. Somit ist zufällig, ob im Mikroplattenleser eine dunkle oder helle Stelle des Kanals gemessen wird. Es ist außerdem keine Abhängigkeit zwischen der Konzentration des Analyts und der Farbintensität zu erkennen. Das macht die Aufnahme einer Kalibrierkurve und somit eine Quantifizierung unmöglich. Da sich der PS-Chip mit der verwendeten ChipShop-Deckfolie als ungeeignet erwies, wurden nur drei Messungen durchgeführt.

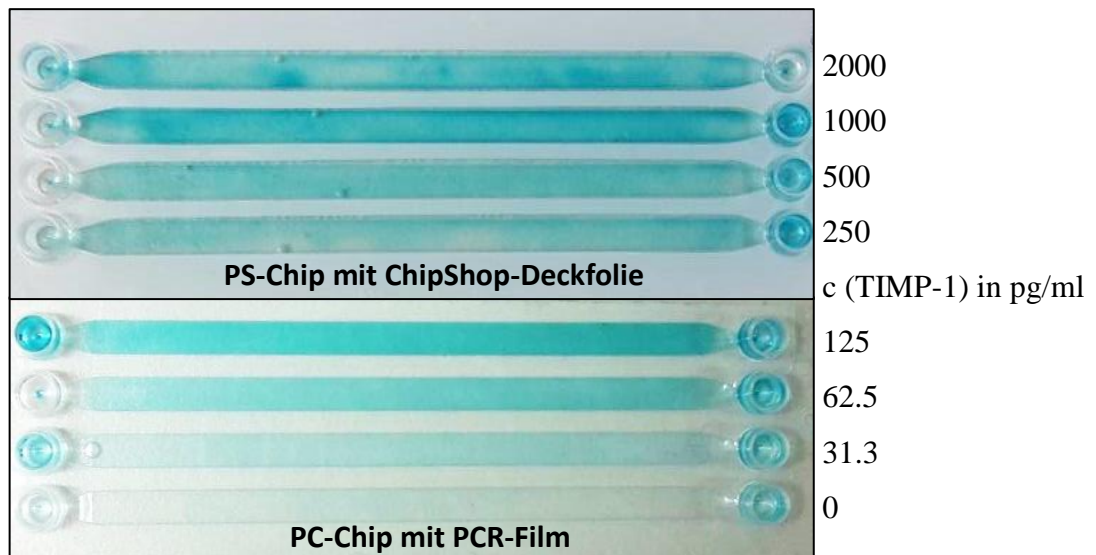


Abbildung 22 ELISA auf dem PS-Chip

5.3.4 Reproduzierbarkeit des Assays

Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurde der ELISA mit einigen ausgewählten Konzentrationen der Kalibrierkurve jeweils im Dreifachansatz auf einem Chip durchgeführt. Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, war der Assay in einem Experiment sehr gut reproduzierbar. Die Standardabweichung bei A_{450} war für alle fünf aufgenommenen Konzentrationen deutlich geringer (höchste Standardabweichung 0.028 bei 5000 pg/ml), als wenn die entsprechenden Werte in mehreren Experimenten aufgenommen wurden (höchste Standardabweichung 0.056 bei 5000 pg/ml). Auch für V_{MAX} betrug die Standardabweichung in einem Experiment höchstens 0.002. Über mehrere Experimente lag die höchste Standardabweichung für V_{MAX} bei 0.006.

In einem Experiment ist mit beiden Detektionsmethoden bereits eine Analyt-Konzentration von 250 pg/ml detektierbar. Bei der Aufnahme der Werte in unterschiedlichen Experimenten ist die Standardabweichung für A_{450} zu hoch, um eindeutig zwischen 250 pg/ml TIMP-1 und der Negativkontrolle unterscheiden zu können. Hier beträgt die niedrigste detektierbare Konzentration der Kalibrierkurve 500 pg/ml TIMP-1. Bei Messung der Absorptionskinetik ist auch dieser Wert noch nicht zuverlässig detektierbar, da die Standardabweichung sich noch immer mit den Werten der Negativkontrolle überschneidet.

Um LOD und LOQ genau berechnen zu können, sind mehr Punkte in der Kalibrierkurve und mehr Replikate jedes Punktes erforderlich.

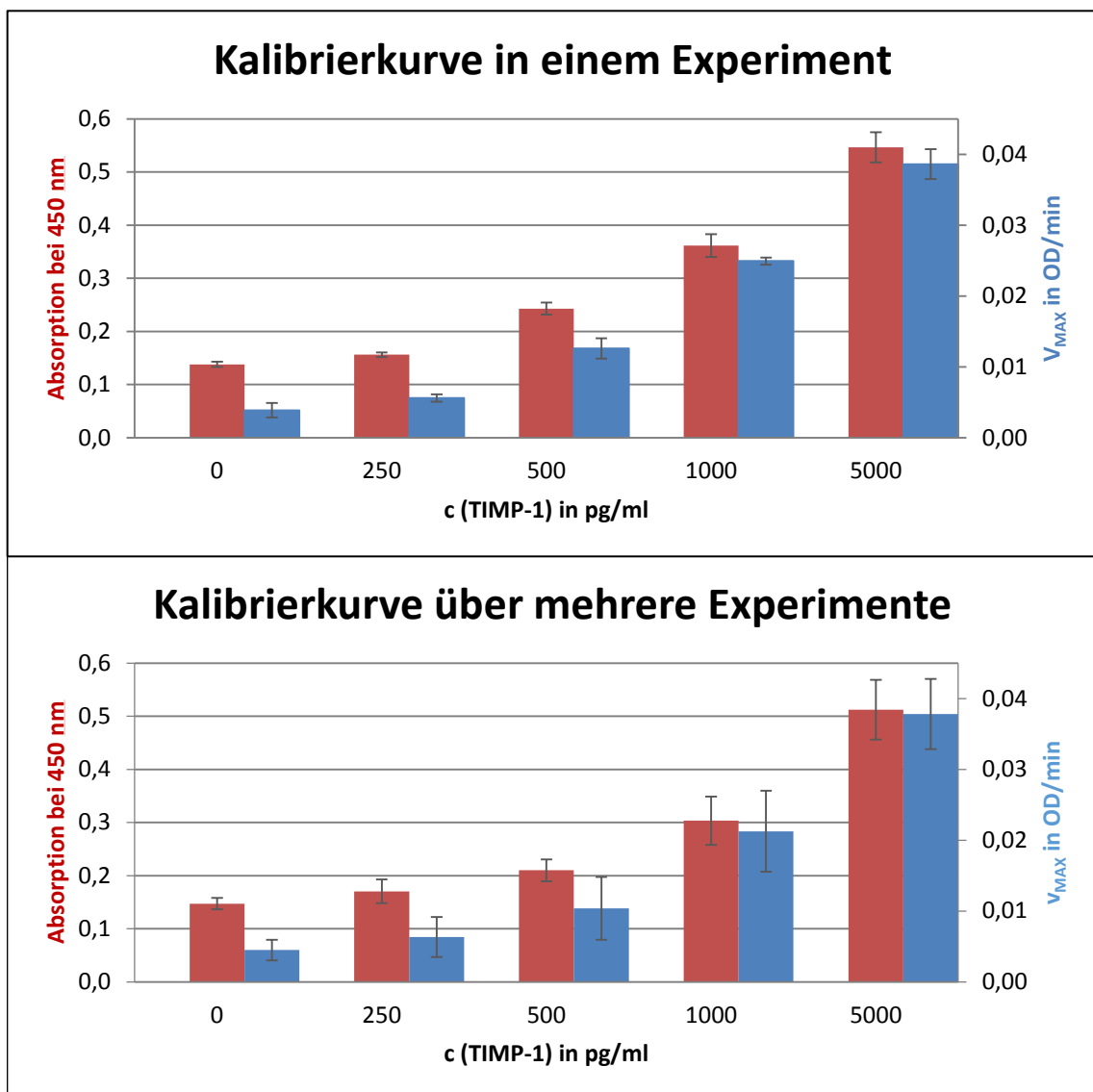


Abbildung 23 Reproduzierbarkeit des Assays auf dem PC-Chip

6 Diskussion

6.1 Eignung homogener Immunoassays

Die Kalibrierkurven der beiden homogenen Immunoassays zeigen, dass SPARCL eher bei niedrigeren Konzentrationen bis 5000 pg/ml TIMP-1 empfindlich ist, während die Sensitivität von AlphaLISA erst ab einer Konzentration von 2500 pg/ml TIMP-1 deutlich zunimmt. In der Produktinformation des AlphaLISA-Kits wird ein Detektionsbereich von 520 bis 100000 pg/ml TIMP-1 angegeben. Mit einem LOD von knapp 1300 pg/ml konnten diese optimalen Werte nicht erreicht werden. Vermutlich liegt das am Alter des verwendeten Kits. Dieses wurde bereits 1.5 Jahre zuvor, im Juli 2015, geöffnet. Dennoch wird hier deutlich, dass SPARCL für Konzentrationen im Pikogramm- bis Nanogramm-Bereich besser geeignet ist.

Der Einfluss von Ascorbinsäure auf Redoxreaktionen ist ein bekanntes Problem, unter anderem bei der amperometrischen Bestimmung von Glukose in Blutproben (Lowry, 1992; Yuan, 2005). Hier kommt es zur Störung der Signalgebung, da Ascorbinsäure ein Antioxidant und damit ein Radikalfänger ist (Koeber, 1988). Die Wirkung auf homogene Immunoassays ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Das Lumineszenz-Signal wird bei beiden Assays durch das Übertragen von Sauerstoffradikalen über eine kurze Distanz generiert. Beim SPARCL sorgt BGR für ein Absenken des Hintergrundsignals, indem es freie Radikale im Hintergrund wegfängt. BGR besteht hauptsächlich aus Ascorbinsäure [URL-13]. Bei erhöhter Zugabe an Ascorbinsäure werden auch signalgebende Radikale weggefangen und das Lumineszenzsignal sinkt immer weiter ab. Der Einfluss auf den AlphaLISA ist nicht eindeutig erkennbar, da hier das Signal erst ansteigt und dann leicht abfällt. Es kann vermutet werden, dass bei geringeren Konzentrationen die Ascorbinsäure hier einen ähnlichen Effekt hat wie das BGR beim SPARCL und das Hintergrundrauschen minimiert. Dies würde den anfänglichen Anstieg der Signalstärke erklären. Mit zunehmender Menge an Ascorbinsäure kommt es jedoch zu einer Inhibition des Signals, da diese auch hier als Radikalfänger den Singulett-Sauerstoff und andere signalgebende Radikale wegfängt.

Die Aufkonzentrierung der Proben diene gleichzeitig auch zur Aufreinigung. Hierbei sollte die Ascorbinsäure aus den Proben entfernt werden. Die Aufkonzentrierung hätte

vor allem für den AlphaLISA eine höhere Empfindlichkeit im niedrigen Konzentrationsbereich bewirkt. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Aufreinigung zwar prinzipiell funktionierte, dabei allerdings ein hoher Anteil des Biomarkers die Membran nicht passieren konnte. Der Verlust von Protein in den Filtereinheiten ist ein bekanntes Problem und niemals vollständig zu vermeiden [URL-14]. Da die Konzentration des Biomarkers TIMP-1 in Urin bereits sehr gering ist und der Verlust an Protein bei über 90 % lag, ist diese Art der Aufreinigung nicht geeignet um Inhibitoren aus der Probe zu entfernen.

Koeber (1988) beschreiben in ihrem Paper eine Methode, um störende Reduktionsmittel wie zum Beispiel Ascorbinsäure zu entfernen. Allerdings ist diese Methode für den SPARCL nicht anwendbar, da die Menge an Ascorbinsäure in Urin von Probe zu Probe schwankt, so dass die Menge an benötigtem Iodat unbekannt ist. Überschüssiges Iodat würde auch das BGR beeinflussen und eine quantitative Detektion des Biomarkers verhindern. Beim AlphaLISA wäre diese Strategie theoretisch denkbar, allerdings ist der Assay zu unempfindlich im niedrigen Konzentrationsbereich und die Aufkonzentrierung war nicht erfolgreich. Somit wurde keine Methode gefunden, um die Inhibition durch Ascorbinsäure zu vermeiden.

Keiner der beiden Assays erwies sich also als geeignet für den quantitativen Nachweis von geringen Mengen unter 1 ng Biomarker in Urinproben. Deshalb lag der Fokus für die weiteren Untersuchungen auf heterogenen Immunoassays.

6.2 Immobilisierungsstrategien für heterogene Immunoassays

Wie zu erwarten, funktionierte der ELISA auf der Nunc-Platte am besten, da diese speziell für Immunoassays konzipiert wurde. Auch war vorhersehbar, dass die Adsorption auf der aktivierten Platte sensitiver ist, als die Immobilisierung mit APTES. Das liegt vor allem daran, dass bei der Adsorption theoretisch alles an der Oberfläche binden kann, während mit APTES nur je ein Antikörper pro APTES-Molekül kovalent gebunden wird. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Adsorption auf einer Zellkulturplatte nicht funktioniert. Deren Oberfläche ist für die Bindung von Zellen optimiert und scheint nur schwach aktiviert zu sein. Deshalb konnten nur sehr wenige Antikörper absorbiert werden. Es ist anzunehmen, dass auf einer unbehandelten PS-Platte keine Antikörper binden können.

Die Immobilisierung mit CMD hätte zu den besten Ergebnissen führen sollen, da theoretisch durch die Oberflächenvergrößerung mehr Antikörper gebunden werden können. Allerdings hat diese Immobilisierungsstrategie nicht funktioniert. Deshalb wurden Änderungen am pH-Wert und den Konzentrationen an EDC, sulfo-NHS und CMD vorgenommen. Die pH-Anpassung wurde vorgenommen, da die Aktivierung mit EDC-NHS am effizientesten in einem pH-Bereich von 4.7 bis 6.0 ist, während das Optimum für die Bindung der Aminogruppen bei einem pH-Wert von 7.0 bis 8.0 liegt [URL-15]. Leider zeigten weder die pH-Anpassung noch die Konzentrationsänderungen eine Verbesserung des Ergebnisses.

Die Silanisierung mit in Ethanol gelöstem APTES hatte einen Effekt auf die Immobilisierung mit CMD. Hier waren die Signalstärken höher als die der Negativkontrolle. Das zeigt, dass hier FITC gebunden wurde, allerdings nur in sehr geringen Mengen. Die Kontrolle für unspezifische Bindungen war dennoch höher. Das war zu erwarten, da das Polymer CMD die Oberfläche abblockt und hier deshalb kaum unspezifischen Bindungen an die Oberfläche erfolgen können (Liberelle, 2010).

Die Negativkontrollen zeigen, dass bei der Nunc-Platte ein besonders hohes unspezifisches Signal generiert wird. Bei der Immobilisierung mit CMD hingegen scheinen kaum unspezifische Signale aufzutreten. Das kann ebenfalls damit erklärt werden, dass das CMD die Oberfläche abblockt und dabei einen ähnlichen Effekt hat wie PBS/BSA. Diese Beobachtung lässt weiterhin vermuten, dass die Immobilisierung des CMDs an der Oberfläche erfolgreich war, jedoch die Antikörper nicht am CMD binden konnten.

Generell kann die Empfindlichkeit des Assays durch die Wahl eines anderen Substrates deutlich verbessert werden. Das TMB-Substrat von ThermoScientific zeigte bei gleicher Menge an verwendetem Enzym eine viel stärkere Absorption als das selbst hergestellte TMB-Substrat.

Es wurden für alle drei Strategien zu wenig Datenpunkte erhoben und zu wenige Wiederholungen durchgeführt um LOD und LOQ berechnen zu können. Jedoch dienten die Tests nur zur Orientierung, welche der Strategien für die Anwendung am geeignetsten ist. Deshalb war eine genaue Bestimmung der Empfindlichkeit nicht nötig. Dennoch lässt sich aus den Untersuchungen schlussfolgern, dass momentan die Adsorption die am besten geeignete Immobilisierungsmethode ist.

6.3 Übertragen des Assays auf einen Mikrochip

Der Assay konnte auf einem Chip realisiert werden. Hierfür waren einige Anpassungen in Bezug auf den zuvor auf der Mikrotiterplatte durchgeführten ELISA nötig. Um unspezifische Bindungen an den Kanalwänden des Chips zu vermeiden, wurde eine höhere Konzentration an BSA von 3 % (w/v) zum Abblocken der Oberfläche verwendet. Zudem wurde die Konzentration an Det-Ab auf 33 ng/ml reduziert. Während bei 50 ng/ml Det-Ab auch die negativen Proben eine relativ hohe Absorption zeigten, war bei 25 ng/ml Det-Ab das Signal der Positivproben sehr schwach. Die Konzentration des Antikörpers lässt sich vermutlich noch weiter optimieren. Für den Assay auf dem Chip wurde außerdem ein "Ready-to-use"-Substrat von Thermo Fisher gewählt. Dieses wies einen deutlich stärkeren Farbumschlag in kürzerer Zeit auf als das zuvor selbst hergestellte TMB-Substrat. Die Inkubationszeit wurde dementsprechend von 20 auf 5 min verkürzt.

Bei der Detektion des Farbumschlags wurden zwei Probleme ersichtlich. Die Tiefe der Kanäle im Chip beträgt nur 350 µm. Dadurch ist die Absorption deutlich schwächer als in einer Mikrotiterplatte. Bei einem Volumen von 100 µl ist hier die Schichtdicke der gemessenen Lösung mit gut 3 mm fast zehnmal so hoch wie im Chip. Laut dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Schichtdicke proportional zur Absorption (Wedler, 1982). Das bedeutet, je höher die Schichtdicke ist, desto höher ist auch die Absorption und desto besser lassen sich geringe Farbunterschiede erkennen. Um also die Empfindlichkeit des Assays zu erhöhen, müsste ein anderes Chipformat mit tieferen Kanälen gewählt werden. Im Idealfall sollte der Assay in einer Reaktionskammer mit einer Tiefe von mehreren Millimetern durchgeführt werden.

Ein weiteres Problem ist die geringe dynamische Spanne des Assays. Als dynamische Spanne wird der Bereich eines Assays bezeichnet, in dem eine lineare Abhängigkeit zwischen der Höhe des Signals und der Konzentration des Analyts zu erkennen ist. Bereits bei 1000 pg/ml TIMP-1 war nach fünf Minuten Inkubation des Substrats ein Umschlag ins Gelbliche zu erkennen. Dieser Farbumschlag wird verursacht, wenn zu viel HRP vorhanden ist und das blaue Reaktionsprodukt weiter oxidiert wird (Liu, 2014). Dieser Prozess verringert die Absorption der Lösung bei 620 nm. Beim Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure bildet sich ein schwarzer Niederschlag, welcher die Absorption bei 450 nm ebenfalls verringert. Es war nicht möglich, die

Inkubationszeit weiter zu verkürzen, da sonst im niedrigen Konzentrationsbereich nicht mehr detektiert werden konnte. Da in klinischen Proben jedoch sehr unterschiedliche Konzentrationen des Biomarkers TIMP-1 detektiert werden müssen [URL-10], ist ein großer Detektionsbereich von Vorteil. Eine Möglichkeit dies zu erreichen, wäre ein Substrat welches auch bei hohen Konzentrationen an HRP keine Präzipitate bildet. Ein Beispiel hierfür ist das *TMB X-tnd*TM [URL-16].

Um die dynamische Spanne auch ohne die Verwendung eines anderen Substrats oder Chip-Designs zu erhöhen, wurde die Absorptionskinetik gemessen. Hier wurde statt des absoluten Wertes der Absorption die Stärke der Steigung in den ersten zwei Minuten ermittelt. Auf der Nunc-Platte zeigte diese Methode eine deutlich breitere dynamische Spanne als die Endpunktmethode. Erst bei 4000 pg/ml TIMP-1 war ein deutliches Abflachen der Kurve erkennbar. Auf dem PC-Chip konnte dieses Verhalten jedoch nicht beobachtet werden. Die Kurvenverläufe von A_{450} und V_{MAX} waren sehr ähnlich. Die dynamische Spanne konnte auf dem Chip durch die Messung der Kinetik also nicht erhöht werden. Die Absorption bei 450 nm zeigte im Konzentrationsbereich bis 1000 pg/ml TIMP-1 nur eine schwache Steigung von 0.0002. Noch niedriger lag die Kurve für die Absorptionskinetik mit einer Steigung von 0.00002. Die geringen Werte für A_{450} und V_{MAX} und der daraus resultierende schwache Anstieg der Kurve wurden durch die geringe Tiefe des Kanals verursacht.

Problematisch waren bei beiden Detektionsmethoden die hohen Standardabweichungen. Um zu ermitteln, ob die Ursache die Effektivität der Reaktionen im Assay oder die Messung des Farbumschlags war, wurde die Reproduzierbarkeit des Assays in einem Experiment überprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass Kanäle gleicher Konzentration auch nahezu gleiche Werte für Absorption und Kinetik liefern. Die dennoch auftretenden hohen Schwankungen zwischen den unterschiedlichen Experimenten lassen sich durch verschiedene Einflüsse erklären. Nicht in jedem Versuch ist die Konzentration der Reagenzien gleich hoch. Pipettierfehler beeinflussen das Produkt genauso wie die Vitalität von Antikörpern und Enzymen. Diese lässt durch wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen nach. Auch die Waschschrte hatten vermutlich Einfluss auf die Reproduzierbarkeit des Assays. Die Pumpe saugte das PBST nicht immer mit gleicher Kraft durch den Kanal. Dadurch kam es zu mehr oder weniger unspezifischen Bindungen an der Oberfläche. Die ungewöhnlich hohen Standardabweichungen lassen

sich jedoch nur dadurch erklären, dass die Zeit zwischen Zugabe des Substrats und Beginn der Messung schwankte. Es war mit den vorhandenen Geräten nicht möglich, die Farbentwicklung auf dem Chip und die Absorption bei 450 nm in jedem Experiment nach exakt der gleichen Zeit zu detektieren. Unterschiede von nur wenigen Sekunden beeinflussten besonders stark die Absorptionskinetik, da das Substrat sehr schnell umgesetzt wurde. Das ist auch daran zu erkennen, dass die Standardabweichungen von V_{MAX} höher als die von A_{450} waren. Um genauere Ergebnisse und damit eine bessere Reproduzierbarkeit zu erreichen, müsste das Verfahren standardisiert werden. Das Substrat könnte zum Beispiel direkt im Detektionsgerät in den Kanal injiziert werden. Dadurch wäre die Zeit zwischen der Zugabe des Substrats und dem Beginn der Kinetikmessung klar definiert. Für ein solches Verfahren würde jedoch auch ein spezieller Chip benötigt werden, bei welchem eine direkte Injizierung des Substrats möglich ist.

Um in dem vorliegenden Chipformat und mit den verfügbaren Geräten eine Quantifizierung des TIMP-1-Analyten vornehmen zu können, müssen in jedem Versuch mehrere Standardproben mitgeführt werden. Es sollte bei der derzeitigen Detektionsmethode sowohl die Absorptionskinetik bei 620 nm, als auch die Absorption bei 450 nm gemessen werden. So können beide Parameter unabhängig voneinander bestimmt und ausgewertet werden.

Ein allgemeiner Vorteil der Kinetikmessung wäre, dass die Reaktion nicht mehr mit Schwefelsäure abgestoppt werden müsste. Dieser Prozess ist äußerst schwierig zu automatisieren, da die Schwefelsäure in den bereits mit Substrat gefüllten Kanal injiziert werden und sich dort vollständig mit dem Substrat vermischen muss. V_{MAX} sollte sich also nach Optimierung der Methode (vor allem durch Verwendung eines Chip-Formats mit tieferen Kanälen) und Standardisierung der Messung (Injektion des Substrats in den Kanal) als besser geeignet für die Quantifizierung des Biomarkers auf dem Chip erweisen.

Die für den PS-Chip verwendete Deckfolie erwies sich als ungeeignet für die Durchführung des Assays. Anfängliche Tests haben gezeigt, dass kein nennenswerter Unterschied zwischen den Materialien Polystyrol und Polycarbonat besteht, was ihre Eignung für einen ELISA betrifft. Das Problem war deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit die doppelseitige Klebefolie des ChipShops. Diese musste

eigenständig auf den Chip aufgebracht werden. Durch geringe Verschiebungen während des Klebens reichte die Folie und damit auch der Kleber an einigen Stellen in die Kanäle. Die Flecken in den Kanälen wurden also vermutlich durch austretenden Kleber während der Durchführung des Assays verursacht. Um zuverlässig eine Kalibrierkurve auf dem PS-Chip aufnehmen zu können, wären maschinell mit der Deckfolie versehene Chips vermutlich besser geeignet. Zwei vorliegende Probechips beschriebener Art zeigten keine erkennbare Inhibition des Assays.

7 Ausblick

Zunächst sollte eine Kalibrierkurve auf PS-Chips mit maschinell verschlossenen Kanälen aufgenommen werden, um zu überprüfen welche Deckfolie (PCR-Film von Eppendorf oder Deckfolie des ChipShops in Jena) geeigneter für die Durchführung des Assays ist. Im Idealfall sollte auf ein anderes Chip-Format mit tieferen Kanälen umgestiegen werden und eine neue Kalibrierkurve aufgenommen werden. Nur der für den vorliegenden Assay sensitivste Chip sollte für alle nachfolgenden Experimente verwendet werden.

Wurde das am besten geeignete Chip-Format ermittelt, sollte noch einmal eine Anpassung der Konzentration an Det-Ab vorgenommen werden. Auch die Konzentration an Meerrettichperoxidase kann überprüft werden. Zudem ist es sinnvoll, die für den Assay benötigte Zeit weitestmöglich zu verkürzen. Danach muss der Assay automatisiert werden. Für die Messung der Absorptionskinetik muss die Injektion des Substrats realisiert werden. Wenn die Messung der Absorption bei 450 nm beibehalten werden soll, muss das Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure ebenfalls automatisiert werden.

Nach erfolgreicher Automatisierung des Immunoassays auf dem Chip können Tests mit klinischen Patientenproben durchgeführt werden.

8 Zusammenfassung

Die beiden homogenen Immunoassays SPARCL und AlphaLISA erwiesen sich als ungeeignet für den quantitativen Nachweis von geringen Mengen an Biomarkern in Urinproben. Ascorbinsäure als Bestandteil des Urins verursachte eine Inhibierung des Signals. Strategien zur Entfernung der Inhibitoren aus der Probe hatten ebenfalls negative Einflüsse auf den Assay und konnten deshalb nicht angewendet werden. Aus diesem Grund wurde ein heterogener Immunoassay etabliert. Die hierbei benötigten Waschschriffe ermöglichen die Entfernung störender Substanzen aus der Probe.

Für den heterogenen Immunoassay wurden drei Strategien für die Immobilisierung auf Polystyrol entwickelt. Die Immobilisierung mit dem Polymer CMD konnte nicht realisiert werden, die Gründe hierfür sind nicht bekannt. Die Immobilisierung durch Adsorption auf einer vorbehandelten Oberfläche erwies sich als sehr effektiv. Die kovalente Immobilisierung der Antikörper mit APTES funktionierte ebenfalls, zeigte jedoch eine geringere Effektivität. Deshalb wurde für die Verwendung eines Lab-on-a-chip-Systems die Adsorption an der Oberfläche als Immobilisierungsstrategie gewählt.

Die Übertragung des Assays auf einen Chip konnte realisiert werden. Die Absorptionmessung gestaltete sich aufgrund der geringen Kanaltiefe von 350 µm jedoch schwierig. Die Empfindlichkeit des Assays konnte auch durch die Messung der Absorptionskinetik nicht wesentlich verbessert werden. Beide Messmethoden führten zu hohen Standardabweichungen. Um dies zu vermeiden, muss die Detektion des Farbumschlags standardisiert werden. Die Konzentrationen an Det-Ab und HRP können noch angepasst werden. Auch die Zeitdauer des gesamten Assays muss verkürzt werden. Danach muss der ELISA auf dem Chip automatisiert werden.

9 Summary

Urine samples contain substances such as ascorbic acid that can negatively affect homogeneous immunoassays by inhibiting oxidative reactions. Accurate detection of low concentrations of biomarkers with the homogeneous immunoassays SPARCL and AlphaLISA in the presence of ascorbic acid was not possible. Evaluated strategies for the removal of the inhibitors had their own adverse effects on the assays and thus could not solve the problem. Therefore, a heterogeneous immunoassay implementing washing steps for the elimination of interfering compounds was chosen for the analysis of such samples.

For the heterogeneous immunoassay, three different strategies to immobilize the capture antibody on a polystyrene surface were developed. The immobilization on the carboxymethyl dextran matrix was ineffective, the reason for that is unknown. The adsorption on an oxygen-treated surface proved to be the best strategy. Covalent conjugation of the antibodies on silanized polystyrene was less effective. For this reason, the physical adsorption was chosen for the further application in microfluidic chips.

It was possible to perform the measurement of different biomarker concentrations on the chip. Detection of the absorbance was not optimal due to the low thickness of the channels. Measurement of absorbance kinetics didn't deliver significantly better results. Both detection methods had high standard deviations. To improve their reproducibility, the measurement must be standardized. Afterwards, the duration of the assay and the concentration of detection antibody and HRP should be adjusted. In the end, the assay on the chip can be automated for a simplified analysis of urine and other liquid samples.

Literaturverzeichnis

Bücher

Clark, D. P.; Pazdernik, N. J. (2009): *Molekulare Biotechnologie - Grundlagen und Anwendungen*. 1. Auflage: Spektrum akademischer Verlag (Heidelberg), S.181-183.

Luttmann, W.; Bratke, K.; Küpper, M.; Myrtek, D. (2009): *Der Experimentator: Immunologie*. 3. Auflage: Spektrum akademischer Verlag (Heidelberg), S.15-16, 107-115.

Rehm, H. (2006): *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 5. Auflage: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag (München), S.177-179.

Wedler, G. (1982): *Lehrbuch der physikalischen Chemie*. 2. Auflage: Verlag Chemie (Weinheim), S.533-535.

Wild, D. (2005): *The Immunoassay Handbook*. 3. Auflage: Elsevier (Oxford), S.3-7.

Quellen aus dem Internet

[URL-01] Robert Koch-Institut (2015): *Epidemiologisches Bulletin*. URL: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2015/Ausgaben/06_15.pdf (Zugriff am 11.04.2017).

[URL-02] DSTATIS Statistisches Bundesamt (o. J.): *Gestorbene nach ausgewählten Todesursachen*. URL: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html;jsessionid=99DA85BB1D79BD23ADBA9116B16DDC36.cae1> (Zugriff am 04.05.2017).

[URL-03] GESUNDHEITSBERICHTERSTATTUNG DES BUNDES (2017): *Sterbefälle (absolut, Sterbeziffer, Ränge, Anteile) für die 10/20/50/100 häufigsten Todesursachen (ab 1998). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region, Alter, Geschlecht, ICD-10*. URL: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=47294673&nummer=6&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=74723470 (Zugriff am 04.05.2017).

[URL-04] Krebsinformationsdienst KID (2016): *PROSTATAKREBS FRÜHERKENNUNG*. URL: <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/prostatakrebs/psa-test-frueherkennung.php#inhalt15> (Zugriff am 11.04.2017).

[URL-05] Krebsinformationsdienst KID (2014): *Prostatakrebs – Früherkennung: PSA-Test noch immer umstritten*. URL: <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/prostatakrebs/psa-test-frueherkennung.php> (Zugriff am 16.04.2017).

[URL-06] BOSTER (o. J.): *ELISA Kits, ELISA Principle - Immunoassays*. URL: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle> (Zugriff am 03.12.2016).

[URL-07] PerkinElmer (o. J.): *AlphaLISA & AlphaScreen No-wash Assays*. URL: <http://www.perkinelmer.de/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/alphalisa-alphascreen-no-wash-assays/alphalisa-alphascreen-no-washassays-main.html> (Zugriff am 17.03.2017).

[URL-08] Xie, W.; Cameron, M. J.; Renuka de Silva; Schumm, D. L.; Pauly, K. C.; Astry, D. P. (2014): *SPARCL - A Sensitive and Cost Effective Homogeneous Immunoassay Technology*. URL: <http://www.lumigen.com/detection-technologies/sparcl> (Zugriff am 03.12.2016).

[URL-09] Lumigen (2013): *Lumigen SPARCL No-Wash Homogeneous Immunoassay*. URL: http://www.lumigen.com/sites/default/files/data-sheets/sparcl_ds.pdf (Zugriff am 03.12.2016).

[URL-10] Lockwood, W. (2015): *The Complete Urinalysis and Urine Tests*. URL: <http://www.rn.org/courses/coursematerial-265.pdf> (Zugriff am 17.05.2017).

[URL-11] PerkinElmer (2015): *Human Metalloproteinase Inhibitor 1 / Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP1) Kit*. URL: https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/TDS_AlphaLISA_AL272.pdf (Zugriff am 13.03.2017).

[URL-12] R&D Systems (o. J.): *Human TIMP-1 DuoSet*. URL: <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dy970.pdf> (Zugriff am 28.03.2017).

[URL-13] Cameron, M. J. (o. J.): *A Generic Pharmacokinetic Assay using SPARCL*. URL: http://www.lumigen.com/sites/default/files/additional-documents/generic_pharmacokinetic_assay_SPARCL.pdf (Zugriff am 24.03.2017).

[URL-14] Merck Millipore (o. J.): *Amicon® Ultra Centrifugal Filters*. URL: http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Amicon-Ultra-Centrifugal-Filters,MM_NF-C134281 (Zugriff am 15.05.2017).

[URL-15] Thermo Fisher Scientific Inc. (2009): *Instructions NHS and Sulfo-NHS*. URL: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011309_NHS_SulfoNHS_UG.pdf (Zugriff am 11.05.17).

[URL-16] Kem-En-Tec Diagnostics A/S (o. J.): *TMB X-tnd*. URL: <http://www.kem-entec.com/tmb-x-tnd/> (Zugriff am 31.07.17).

Lumigen (o. J.): *Lumigen SPARCL™ Detection Kit*.

Zeitschriftenartikel

Akhavan-Tafti, H.; Binger, D. G.; Blackwood, J. J. et al. (2013): *A homogeneous chemiluminescent immunoassay method*. *Journal of the American Chemical Society*, 135 (11), S. 4191–4194.

Beaudet, L.; Rodriguez-Suarez, R.; Venne, M.-H. et al. (2008): *AlphaLISA immunoassays: the no-wash alternative to ELISAs for research and drug discovery*. *Nature Methods*, 5 (12), S. 8–9.

Brew, K.; Nagase, H. (2010): *The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity*. *Biochimica et biophysica acta*, 1803 (1), S. 55–71.

- Chin, C. D.; Laksanasopin, T.; Cheung, Y. K. et al. (2011): *Microfluidics-based diagnostics of infectious diseases in the developing world*. *Nature medicine*, 17 (8), S. 1015–1019.
- Curran, S.; Murray, G. I. (1999): *MATRIX METALLOPROTEINASES IN TUMOUR INVASION AND METASTASIS*. *Journal of Pathology*, 189, S. 300–308.
- Dixit, C. K.; Vashist, S. K.; MacCraith, B. D.; O’Kennedy, R. (2011): *Multisubstrate-compatible ELISA procedures for rapid and high-sensitivity immunoassays*. *Nature protocols*, 6 (4), S. 439–445.
- Durkan, G. C.; Nutt, J. E.; Marsh, C. et al. (2003): *Alteration in Urinary Matrix Metalloproteinase-9 to Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Ratio Predicts Recurrence in Nonmuscleinvasive Bladder Cancer*. *Clinical Cancer Research*, 9, S. 2576–2582.
- Eglen, R. M.; Reisine, T.; Roby, P. et al. (2008): *The Use of AlphaScreen Technology in HTS: Current Status*. *Current Chemical Genomics*, 1, S. 2–10.
- Gong, Y.; Chippada-Venkata, U. D.; Oh, W. K. (2014): *Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression*. *Cancers*, 6 (3), S. 1298–1327.
- Henaresa, T. G.; Mizutania, F.; Hisamoto, H. (2008): *Current development in microfluidic immunosensing chip*. *Analytica Chimica Acta*, 611, S. 17–30.
- Ibrahim, A. D. (2006): *Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances*. *International Journal of Biomedical Science*, 2 (3), S. 217–235.
- Kaufman, B. M.; Clower, M. (1991): *Immunoassay of pesticides*. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 74 (2), S. 239–247.
- Kaur, J.; Suri, C. R. (2007): *Direct hapten coated ELISA for immunosensing of low molecular weight analytes*. *Protocol Exchange*.
- Koeber, L.; Rittersdorf, W.; Werner, W. (1988): *METHOD FOR THE DETERMINATION OF REDOX REACTIONS USING IODATE TO ELIMINATE ASORBIC ACID INTERFERENCE*. *Patent-Nummer 4,957,872*. United States Patent.
- Liberelle, B.; Boucher, C.; Chen, J.; Jolicoeur, M.; Durocher, Y.; Crescenzo, G. de (2010): *Impact of epidermal growth factor tethering strategy on cellular response*. *Bioconjugate chemistry*, 21 (12), S. 2257–2266.
- Lin, C.-C.; Wang, J.-H.; Wu, H.-W.; Lee, G.-B. (2010): *Microfluidic Immunoassays*. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 15 (3), S. 253–274.
- Liu, Y.; Zhu, G.; Yang, J.; Yuan, A.; Shen, X. (2014): *Peroxidase-like catalytic activity of Ag₃PO₄ nanocrystals prepared by a colloidal route*. *PloS one*, 9 (10), S. 1–7.
- Lowry, J. P.; O’Neill, R. D. (1992): *Homogeneous mechanism of ascorbic acid interference in hydrogen peroxide detection at enzyme-modified electrodes*. *Anal. Chem.*, 64 (4), S. 453–456.

- Mata-Cantero, L.; Cid, C.; Gomez-Lorenzo, M. G. et al. (2015): *Development of two novel high-throughput assays to quantify ubiquitylated proteins in cell lysates: application to screening of new anti-malarials*. *Malaria journal*, 14 (200), S. 1–16.
- Naruo, S.; Kanayama, H.-o.; Takigawa, H.; Kagawa, S.; Yamashita, K.; Hayakawa, T. (1994): *SERUM LEVELS OF A TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASES-1 (TIMP-1) IN BLADDER CANCER PATIENTS*. *International Journal of Urology*, 1, S. 228–231.
- Ricci, S.; Bruzzese, D.; Di Carlo, A. (2015): *Evaluation of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, NGAL and MMP-9/NGAL complex in urine and sera from patients with bladder cancer*. *Oncology letters*, 10 (4), S. 2527–2532.
- Rossier, J. S.; Girault, H. H. (2001): *Enzyme linked immunosorbent assay on a microchip with electrochemical detection*. *Lab on a chip*, 1 (2), S. 153–157.
- Ullman, E. F.; Kirakossian, H.; Switchenko, A. C. et al. (1996): *Luminescent oxygen channeling assay (LOCITM): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method*. *Clinical Chemistry*, 42 (9), S. 1518–1526.
- Yuan, C.-J.; Hsu, C.-L.; Wang, S.-C.; Chang, K.-S. (2005): *Eliminating the Interference of Ascorbic Acid and Uric Acid to the Amperometric Glucose Biosensor by Cation Exchangers Membrane and Size Exclusion Membrane*. *Electroanalysis*, 17 (24), S. 2239–2245.

Anhang**Tabelle 3 Werte, Kalibrierkurve SPARCL**

TIMP-1 in pg/ml	50000	10000	5000	2500	1000	500	250	100	10	0
MAX RLU	18861,33	15528,00	10674,67	4738,67	1250,67	520,00	200,00	90,67	60,00	66,67
StAbw (MAX RLU)	442,35	1063,82	630,55	234,92	200,85	13,86	21,17	9,24	104,00	4,62
S/S0	282,92	232,92	160,12	71,08	18,76	7,80	3,00	1,36	0,90	1,0
StAbw (S/S0)	6,64	15,96	9,46	3,52	3,01	0,21	0,32	0,14	0,08	0,07

Tabelle 4 Werte, Kalibrierkurve AlphaLISA

TIMP-1 in pg/ml	50000	10000	5000	2500	1000	500	250	100	10	0
MAX RLU	140217,00	17410,50	5601,00	1773,00	496,50	370,00	416,00	411,00	420,50	562,50
StAbw (MAX RLU)	6655,29	1477,15	74,95	94,75	30,41	15,56	48,08	11,31	86,97	113,84
S/S0	249,27	30,95	9,96	3,15	0,88	0,66	0,74	0,73	0,75	1,00
StAbw (S/S0)	11,83	2,63	0,13	0,17	0,05	0,03	0,09	0,02	0,15	0,20

Tabelle 5 Berechnungen zu LOD- und LOQ-Werten

SPARCL	AlphaLISA
$LOD (S/S0) = 1 + 3 \times 0.07 = 1.21 (S/S0)$	$LOD (S/S0) = 1 + 3 \times 0.2 = 1.6$
$LOD \left(\frac{pg}{ml} TIMP1 \right) \frac{1.21 + 4.4952}{0.032} = 178.3$	$LOD \left(\frac{pg}{ml} TIMP1 \right) \frac{1.6 + 4.8943}{0.005} = 1298.9$
$LOQ (S/S0) = 1 + 10 \times 0.07 = 1.7$	$LOQ(S/S0) = 1 + 10 \times 0.2 = 3$
$LOQ \left(\frac{pg}{ml} TIMP1 \right) \frac{1.7 + 4.4952}{0.032} = 193.63$	$LOQ \left(\frac{pg}{ml} TIMP1 \right) \frac{3 + 4.8943}{0.005} = 1578.9$

Tabelle 6 Werte, Einfluss von Ascorbinsäure auf SPARCL

Ascorbinsäure in mg/l	0	100	350	3000
MAX RLU (1000 pg/ml TIMP-1)	1448	728	296	32
StAbw (1000 pg/ml TIMP-1)	135,8	56,6	33,9	11,3
MAX RLU (0 pg/ml TIMP-1)	60	44	56	12
StAbw (0 pg/ml TIMP-1)	5,7	5,7	33,9	5,7
S/S0	24,1	16,5	5,3	2,7
StAbw (S/S0)	2,3	1,3	0,6	0,9

Tabelle 7 Werte, Einfluss von Ascorbinsäure auf AlphaLISA

Ascorbinsäure in mg/l	0	100	350	3000
MAX RLU (1000 pg/ml TIMP-1)	2033,7	2117,3	1580,3	985,0
StAbw (1000 pg/ml TIMP-1)	124,6	307,8	298,0	131,9
MAX RLU (0 pg/ml TIMP-1)	1022,0	1007,0	700,0	510,5
StAbw (0 pg/ml TIMP-1)	149,9	52,3	45,3	21,9
S/S0	2,0	2,1	2,3	1,9
StAbw (S/S0)	0,1	0,3	0,4	0,3

Tabelle 8 Werte, Aufkonzentrierung der Probe

MAX RLU	Aufkonzentriert	Nicht aufkonzentriert	(-)	(-)
Ohne Ascorbinsäure	168	2536	112	112
Mit Ascorbinsäure	192	32	-	-
S/S0	Aufkonzentriert	Nicht aufkonzentriert	(-)	(-)
Ohne Ascorbinsäure	1.5	22.64	1	1
Mit Ascorbinsäure	1.71	0.29	-	-

Tabelle 9 Werte, Immobilisierungsstrategien für heterogene Immunoassays, Absorption bei 450 nm

pg/ml TIMP-1	2500	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	25	0
Adsorption Nunc-Platte	3,00				0,85				0,35	0,30
StAbw	0,000				0,071				0,071	0,000
Adsorption aktivierter Zellkulturplatte		1,00	0,70	0,40	0,20	0,07	0,06	0,06		0,06
StAbw		0,000	0,141	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000		0,021
Adsorption Zellkulturplatte		0,08	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05		0,06
StAbw		0,014	0,007	0,007	0,000	0,014	0,000	0,000		0,007
Immobilisierung mit APTES		0,75	0,40	0,20	0,10	0,08	0,07	0,06		0,06
StAbw		0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000		0,007
Immobilisierung mit CMD		0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04		0,04
StAbw		0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000
Immobilisierung mit CMD Optimierung		0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03		0,03
StAbw		0,011	0,003	0,005	0,001	0,002	0,003	0,001		0,006

Tabelle 10 Werte, Optimierung der CMD-Immobilisierung mit FITC

	Strategie 1 normal	Strategie 2 weniger EDC/NHS	Strategie 3 nur EDC	Strategie 4 CMD-Oligo- Mix	Kontrolle 1 100% Fluoreszenz	Kontrolle 2 unspezifische Bindungen	Kontrolle 3 0% Fluoreszenz
MW	1686	1758	1880	1800	86168	2248	1782
StAbw.	92	44	51	60	1835	127	103
	ohne Boratpuffer	17.5 µl Boratpuffer	35 µl Boratpuffer		Kontrolle 1 100% Fluoreszenz	Kontrolle 2 unspezifische Bdg.	Kontrolle 3 0% Fluoreszenz
MW	4020	3464	3532		139760	4120	2560
StAbw.	481	441	175		0	0	0

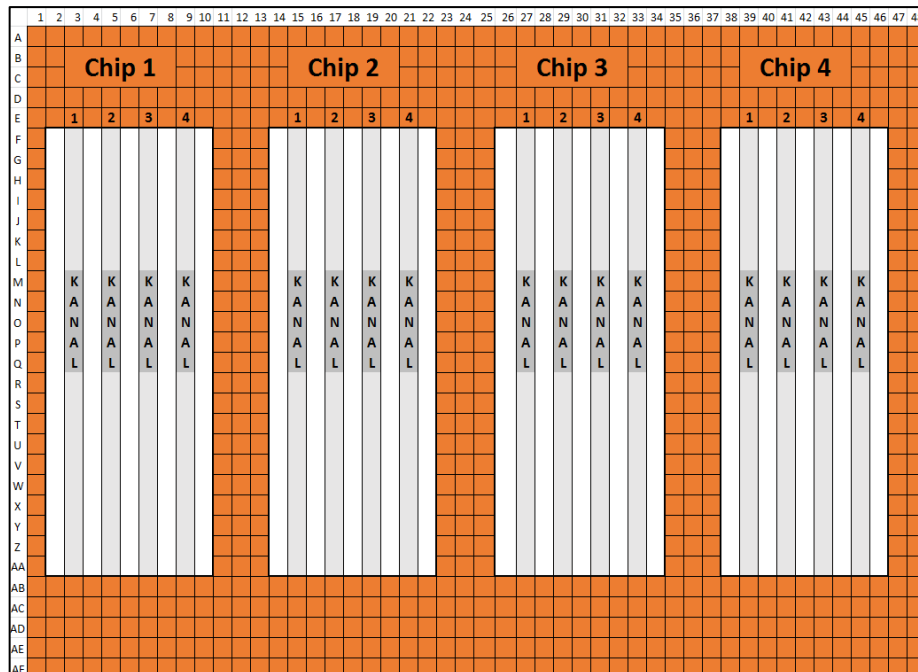


Abbildung 24 Mikrochip-Rahmen als 1536-well Mikrotiterplatte betrachtet

Repeated ✕

Parameters:

Name:

TotalTime: (1 - 86400 s)

Counting Time: (0.05 - 600 s)

Cycle Time: (12.00 - 6000 s)

Repeats: (1 - 999)

Lamp Energy: (0 - 65535)

Measurement Filter:

Abbildung 25 Parameter für "Absorbance Repeated"

Tabelle 11 Werte, Kalibrierkurve auf dem Chip

TIMP-1	Nunc-Platte		PC-Chip		TIMP-1	Nunc-Platte		PC-Chip	
	A450	VMAX	A450	VMAX		A450	VMAX	A450	VMAX
0 pg/ml	0,268	0,024	0,136	0,005	1000 pg/ml	2,525	0,192	0,286	0,026
	0,240	0,004	0,139	0,002		2,488	0,195	0,316	0,025
	0,369	0,020	0,165	0,006		2,566	0,363	0,283	0,015
	0,227	0,029	0,149	0,003		2,566	0,408	0,233	0,013
	0,303	0,011	0,142	0,005		2,531	0,439	0,358	0,024
			0,152	0,005			0,344	0,025	
MW	0,281	0,018	0,147	0,004	MW	2,535	0,319	0,303	0,021
StAbw	0,057	0,010	0,011	0,001	StAbw	0,033	0,118	0,046	0,006
125 pg/ml	0,480	0,019	0,135	0,009	2000 pg/ml	2,559	0,526	0,482	0,031
	0,419	0,017	0,139	0,004		2,559	0,367	0,434	0,031
	0,561	0,028	0,167	0,004		2,562	0,860	0,396	0,026
	0,560	0,024	0,150	0,003		2,571	0,870	0,338	0,025
	0,606	0,024	0,141	0,003		2,571	0,793	0,455	0,035
			0,150	0,005			0,512	0,039	
MW	0,525	0,022	0,147	0,005	MW	2,564	0,683	0,436	0,031
StAbw	0,075	0,004	0,012	0,002	StAbw	0,006	0,225	0,062	0,005
250 pg/ml	0,811	0,029	0,156	0,012	4000 pg/ml	2,567	0,977	0,551	0,041
	0,625	0,023	0,159	0,005		2,528	0,882	0,507	0,044
	1,301	0,063	0,208	0,006		2,612	1,087	0,521	0,037
	1,199	0,063	0,154	0,004		2,619	1,007	0,453	0,036
	1,227	0,054	0,158	0,004		2,600	1,099	0,543	0,040
			0,189	0,007			0,603	-	
MW	1,033	0,046	0,171	0,006	MW	2,585	1,010	0,530	0,040
StAbw	0,297	0,019	0,022	0,003	StAbw	0,038	0,089	0,050	0,016
500 pg/ml	1,653	0,068	0,224	0,018	5000 pg/ml	2,744	1,076	0,539	0,031
	1,565	0,069	0,207	0,011		2,729	0,996	0,492	0,042
	2,373	0,168	0,217	0,008		2,750	1,003	0,532	0,045
	2,308	0,146	0,170	0,005		2,804	1,258	0,416	0,036
	2,353	0,132	0,217	0,010		2,800	0,962	0,511	0,035
			0,226	0,011			0,584	0,038	
MW	2,050	0,117	0,210	0,010	MW	2,765	1,059	0,512	0,038
StAbw	0,405	0,046	0,021	0,004	StAbw	0,034	0,119	0,056	0,005

Tabelle 12 Werte, Reproduzierbarkeit des Assays auf dem PC-Chip

TIMP-1	A450	VMAX
0 pg/ml	0,14320	0,00500
	0,13360	0,00360
	0,13680	0,00300
MW	0,13787	0,00387
StAbw	0,00489	0,00103
250 pg/ml	0,15720	0,00540
	0,16000	0,00620
	0,15140	0,00520
MW	0,15620	0,00560
StAbw	0,00439	0,00053
500 pg/ml	0,23680	0,01220
	0,25600	0,01420
	0,23580	0,01140
MW	0,24287	0,01260
StAbw	0,01138	0,00144
1000 pg/ml	0,33660	0,02440
	0,37220	0,02500
	0,37540	0,02540
MW	0,36140	0,02493
StAbw	0,02154	0,00050
5000 pg/ml	0,51540	0,04060
	0,57120	0,03880
	0,55240	0,03640
MW	0,54633	0,03860
StAbw	0,02839	0,00211

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Leipzig, den 11.08.17



Sarah Haenelt