Entwicklung eines präzisen, schnellen und automatischen Biochip-Systems für patientennahe Sepsis-Diagnostik

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Angewandte Wissenschaften

Institut für Mikrosystemtechnik

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

2010

vorgelegt von

Manuel Kemmler

Dekan:

Prof. Dr. Bernd Becker

Referenten:

PD Dr. Albrecht Brandenburg

Prof. Dr. Roland Zengerle

Tag der Disputation:

9. Mai 2011

Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK)
Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung
Fakultät für Angewandte Wissenschaften
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten (Promotionsberaterinnen oder Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Freiburg, den 27. Juli 2011

Manuel Kemmler

Wannerstraße 27

79106 Freiburg

Danksagung

Zunächst gilt mein großer Dank Albrecht Brandenburg vom Fraunhofer Institut für Physikalische Messtechnik in Freiburg für die Ermöglichung dieser Arbeit und die stets ausgezeichnete und umfassende Betreuung in technischen, planungstechnischen und zu bestimmten Zeitpunkten auch psychologischen Belangen.

Auch bedanke ich mich herzlich bei Erwin Schleicher von der Universitätsklinik in Tübingen für die Ermöglichung dieser Arbeit, die exzellente Unterstützung und Betreuung in klinischen Belangen.

Auch vielen Dank an Roland Zengerle vom Institut für Mikrosystemtechnik in Freiburg für die Betreuung und stark inspirierenden Diskussionen, die meines Erachtens sehr positiv zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Zusätzlich bedanke ich mich an dieser Stelle bei zahlreichen Kollegen, Diplomanten, Praktikanten und HiWis am Fraunhofer IPM, die diese Arbeit von vielen Seiten her unterstützt haben. Hierzu gehören: Stefan Adolph, Silke Bender, Christian Erhardt, Joachim Haas, Thomas Hinrichs, Birgit Koger, Steffen Lott, Norbert Saum, Sarah Schickinger, Jens Scherer, Heinz Schulte, Stephan Sommersdorf, Gerd Sulz und Erich Zähringer.

Ein weiterer großer Dank geht an das EU-Projekt Care-Man unter der Leitung von Günter Gauglitz vom Institut für Physikalische und Theoretische Chemie in Tübingen. Hier bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe des IPTC für die Unterstützung, wie auch Claudia Preininger und Ursula Sauer vom Austrian Institute of Technology in Seibersdorf Österreich. Auch bedanke ich mich bei Andreas Nicol von Bayer Technology Services und Elke Reifenberger von Siemens Medical Solutions Diagnostics für die Bereitstellung von ausreichend Munition in Form von planaren Wellenleiterchips. Bei Petra Krämer und Elisabeth Kremmer vom Helmholtz Center in München möchte ich mich bedanken, sowie bei Albrecht Pfäfflin von der Universitätsklinik in Tübingen, Frantisek Skrob von Exbio in Tschechien, Milan Franek vom Veterinary Research Institute in Tschechien für hilfreiche Diskussionen und die Bereitstellung essentieller Reagenzien. Ich bedanke mich bei Peter Koltay von Biofluidix in Freiburg für die Möglichkeit mit dem Spotter TopSpot zu arbeiten und für die Hilfe von Kiril Kalkandjiev, außerdem danke ich Ralf Reski von der Plant Technology in Freiburg für die Benutzung des Lasercanners.

Zuletzt geht mein großer Dank an meine Familie, meinen Vater Peter, meine Mutter Marlene und meine Schwester Andrea für die Unterstützung in allen Lebenslagen und für die wichtige Ablenkung in meinen Regenerationsphasen. Dies gilt auch in vollem Umfang für meine engsten Freunde und meine Freundin Verena. Ihr wisst, wer ihr seid und ich weiß dies zu meinem großen Glück auch.

Abstract

Severe sepsis has a high incidence and mortality. Over the last years sepsis has an increasing incidence having presently 51-95 new cases per 100 000 persons in industrialised countries. Therefore numbers of cases of death are still growing, although the latest numbers of mortality are 18 % being constantly decreasing for countries in Europe and USA. The point-of-care testing (POCT) takes advantage of on-site patient testing reducing the therapeutic-turn-around-time (TTAT), since the patient sample needs not be sent to a clinical laboratory. For sepsis a reduction of the TTAT is essential and could lead to a further reduction of the mortality rate.

This dissertation reports about the realization and integration of methods into a system fulfilling the important criteria for POCT. The requirements are low testing time, use of small sample volumes, compactness, cost efficiency, fluid handling, automation and a high sensitive detection technique. For this purpose a fluidic unit was developed and combined with an optical unit. The optical unit is based on Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) by use of special waveguide biochips. The system reads out microarray based multi parameter immunofluorescence assays. This system is deeply characterised.

For diagnosis of sepsis and its severity the protein biomarkers C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL-6), procalcitonin (PCT) and neopterin (NPT) are integrated in a multiparameter on-chip immunofluorescence assay. Several standard curves were generated by three-fold replicates in a standard serum substitute solution with 4 % human serum albumin and human plasma containing spiked standard analytes. PCT and IL-6 are carried out in a sandwich assay format whereas NPT and CRP are processed in a binding inhibition format. Both assay types are processed in parallel by the fluidic unit. The assay time for a single multi parameter assay could be reduced from three hours to 25 minutes. The protein chip is processed fully automated using 10 µL sample. To execute the two assay formats in parallel, a fluid handling method was developed performing dilution, mixing, pre-incubating and incubating processes. All fluidic and optical processes are executed automatically.

An additional important demand for POCT is the accuracy and precision of the measurements. For this purpose on-chip reference methods were developed, investigated and integrated in form of a reference reaction processed in parallel to the clinical assays. Three different reference methods were analysed by forming new standard curves. Especially one of the three methods was able to reduce spot-to-spot variances and chip-to-chip variances drastically.

The combination of the fields of activity in this dissertation is leading to an integrated system performing immunoassays for sepsis relevant markers accurate, fast and automated.

INHHALTSVERZEICHNIS SEITE

I Einleitung **1**

1 Hintergrund und Motivation **1**

2 Zielsetzung **2**

II Theoretische Grundlagen **3**

3 Biotechnische und Biochemische Grundlagen **3**

3.1 Antigene und Antikörper **3**

3.2 Biochips **4**

3.3 Oberflächenfunktionalisierung für Biochips **6**

3.4 Analyse von Biochipsignalen **7**

3.5 Formate von Immun-Tests **11**

3.5.1 Antigen-Antikörper-Bindung 11
3.5.2 Indirekter Test 12
3.5.3 Direkter Test 12
3.5.4 Kompetitive- und Bindungsinhibitions-Tests 13
3.5.5 Nicht-kompetitiver Test 15

4 Physikalische Grundlagen **16**

4.1 Fluoreszenz **16**

4.2 Total Internal Reflection Fluorescence **18**

4.2.1 Totalreflektion 18
4.2.2 Evaneszentfeld 20
4.2.3 Wellenleiterchip mit optischem Gitter 23

4.3 Abstrahlcharakteristik oberflächennaher Fluorochrome **24**

4.4 Dämpfung **26**

4.5 Theoretische Berechnung der Anregung durch TIRF **26**

4.6 Fluidik **31**

4.6.1 Diffusion 31
4.6.2 Dispersion 34

5 Diagnose **37**

5.1 Sepsis **37**

5.1.1 Definition 37

5.1.2 Epidemiologie ... 38
5.1.3 Diagnose ... 39

5.2 Patientennahe Diagnostik ... 41

6 Stand der Technik ... 42

6.1 Systeme ... 42
6.1.1 Kommerzielle patientennahe Diagnostika ... 42
6.1.2 Kommerzielle Biochipreader ... 44
6.1.3 Limitierungen ... 46

6.2 Immun-Tests ... 47
6.2.1 Immun-Tests für patientennahe Diagnostik ... 47
6.2.2 Methoden für Tests mit Referenzierung ... 48

III Experimentelles ... 51

7 Herstellung von Biochips ... 51

7.1 Reinigung der Wellenleiterchips ... 51

7.2 Tauchbeschichtung mit Epoxidharz ... 51

7.3 Chips zur Charakterisierung der Optik-Einheit ... 52

7.4 Spotting ... 53

7.5 Blocken ... 54

8 Biochip-System WLS ... 54

8.1 Optik-Einheit ... 55
8.1.1 Komponenten ... 55
8.1.2 Dynamischer Bereich der CCD-Kamera ... 56

8.2 Fluidik-Einheit ... 57

9 Messaufbauten ... 58

9.1 Abstrahlcharakteristik ... 58

9.2 Dosierung und Multilamination ... 59

IV Ergebnisse und Diskussion ... 60

10 Untersuchung der Abstrahlcharakteristik ... 60

11 Herstellung von Biochips ... 62

11.1 Reinigung und Epoxid-Schicht **62**

11.2 Spotting **64**

12 Charakterisierung der Optik-Einheit **66**

12.1 Nachweisgrenze **66**

12.2 Dynamischer Bereich **69**

12.3 Bestimmung der Mikrospot-Intensität **71**

12.4 Untersuchung der Reproduzierbarkeit **73**

13 Fluidik-Einheit **74**

13.1 Multilamination und Dosierung **74**

13.2 Mischen durch Taylor-Dispersion **76**

13.3 Einstellung der optimalen Inkubationsphase **77**

13.3.1 Eruierung des Inkubationsbereichs 77

13.3.2 Verifizierung des Inkubationsbereichs 79

13.4 Durchführung von Immun-Tests **79**

14 Automatisierung des Messvorgangs **83**

15 Multiparameter-Tests **85**

15.1 Standardkurven in Serumersatz **85**

15.2 Standardkurven in humanem Plasma **87**

16 Fehlerquellen für das Wellenleitersystem **90**

16.1 Wellenleiterchip **92**

16.2 Fluidik-Einheit **92**

16.3 Reaktion und Biochemie **93**

17 Referenzierung für das Wellenleitersystem **96**

17.1 Reaktion und Signalaufnahme **96**

17.2 Berechnung heterogene Referenzierung **98**

17.3 Berechnung homogener Referenzierung **100**

17.4 Korrekturfaktor **101**

17.5 Zweikanalige homogene Referenzierung **102**

17.5.1 Auswahl des Farbstoffs 102
17.5.2 Korrekturen mit zweikanaliger homogener Referenzierung 106

17.6 Einkanalige homogene Referenzierung 106
17.6.1 Einkanalige homogene Spot-zu-Spot Korrektur 107
17.6.2 Einkanalige homogene Chip-zu-Chip Korrektur 108
17.6.3 Standardkurven mit einkanaliger homogener Referenzierung 108

17.7 Heterogene Referenzierung 110
17.7.1 Heterogene Spot-zu-Spot Korrektur 111
17.7.2 Heterogene Chip-zu-Chip Korrektur 112
17.7.3 Standardkurven in Puffer mit heterogener Referenzierung 114
17.7.4 Standardkurven in Plasma mit heterogener Referenzierung 118

17.8 Kapazität der Referenzreaktion 124

V Zusammenfassung und Ausblick 126

18 Zusammenfassung 126

19 Ausblick 129

20 Anhang i

20.1 Quellenverzeichnis i

20.2 Abkürzungsverzeichnis viii

20.3 Veröffentlichungen ix

20.4 Liste der Substanzen x

I Einleitung

1 Hintergrund und Motivation

Sepsis ist ein Krankheitsbild, bei dem ein schnelles Diagnoseverfahren benötigt, damit die richtige Therapie vom Arzt für den Patienten schnell gewählt werden kann. Point-of-Care-Testing (POCT) bezeichnet solche patientennahe Tests. POCT kann die Zeit von der Probenentnahme bis zum Erhalt des Testresultats, die so genannte Therapeutic-Turn-Around-Time (TTAT), deutlich verkürzen. Zusätzlich bedeutet POCT eine Dezentralisierung der großen Zentrallabore. Denn das Analysegerät kommt zum Patienten und nicht der Patient bzw. die Patientenprobe zum Analysegerät. Dadurch können wichtige diagnostische Entscheidungen schneller getroffen und die Therapie folglich früher gestartet werden. Dies kann bei der Sepsis Leben retten, denn die Überlebenschance eines Patienten mit Sepsis nimmt stündlich um 6 % ab [1]. Aktuelle Studien zur Sepsis zeigen hohe Sterberaten auf, allein in Deutschland sterben 60 000 Menschen pro Jahr an den Folgen der Sepsis. Diese hohe Sterblichkeit zu reduzieren, ist somit von großem gesellschaftlichem Interesse, was durch ein geeignetes POCT-System erreicht werden könnte. Einsatzgebiete eines solchen POCT-Systems können hierfür beim Notdienst, im Operationssaal, auf Intensivstationen, in ambulanten Bereichen oder direkt in den Arztpraxen sein. [2; 3]

Für die Diagnose von Sepsis können spezielle Immun-Tests verwendet werden. Diese sind so konzipiert, dass sie bestimmte Parameter in einer Blutprobe detektieren können, um eine konkrete Diagnose zu stellen. Für die Diagnose einer Sepsis werden sehr häufig die Parameter C-reaktives Protein, Interleukin-6, Procalcitonin und Neopterin eingesetzt. Auf Grund der schnellen Testzeit ist es deshalb von Vorteil die benötigten Parameter gleichzeitig zu erfassen. Daher sollte das Testformat in der Lage sein, diese Parameter parallel zu erfassen, also mit einem Multi-Parameter-Test. Ziel der Diagnose ist es, zwischen einem Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS), Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock unterscheiden zu können, da diese Differenzierung „essentiell für die spezifische Therapie“ für den Patienten ist [4]. [4-12]

Das von der europäischen Kommission geförderte Projekt „Health-CARE by Biosensor Measurement And Networking“, kurz Care-Man, hat die Lösung dieses Problems als Ziel. Hierbei sollen u. a. neue und vollautomatische POCT-Systeme entwickelt werden, die auf Basis fortschrittlicher Biosensor-Technologie aufbauen. Die vorgestellte Arbeit findet im Rahmen dieses EU-Projekts statt.

2 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es, einen Multi-Parameter-Test für die Diagnose einer Sepsis mit den vier Analyten C-reaktives Protein (CRP), Interleukin-6 (IL-6), Procalcitonin (PCT) und Neopterin (NPT) zu etablieren. In diesem Zusammenhang wird ein Multi-Parameter-Test auf das Format eines neuen optischen Detektionssystems übertragen und für die Diagnose einer Sepsis optimiert. Das Detektionssystem ist ein Wellenleiterfluorometer (WLS) und stand zum Beginn der Arbeit zur Verfügung. Das WLS ist in der Lage, Signale eines fluoreszierenden Mikroarrays hoch-sensitiv zu erfassen. Der zu übertragende Test ist ein Fluoreszenz-Immun-Test auf Basis von Mikroarrays auf Objektträgern des Projektpartners Austrian Institute of Technology, der manuell prozessiert wird. Der lineare Messbereich der Parameter im System soll die physiologischen Werte bis hoch zu den pathogen erhöhten Werten abdecken. Da CRP mit 1-5 mg/l [13] im Serum physiologisch einen hohen Wert aufweist und im Vergleich IL-6 dazu einen sehr niedrigen Wert von < 10 ng/l, kann der Test nicht einfach durch Verdünnen des Plasmas eingestellt werden. Dennoch wird verdünnt, um Matrix-Effekte zu minimieren. Als Matrix-Effekte werden in der Probe befindliche Stoffe genannt, die neben dem Analyten auftreten und das Test-Signal negativ beeinflussen. Der Test wird auf die zu entwickelnde Fluidik-Einheit übertragen. Die Durchführung des Tests soll vollautomatisiert ablaufen und innerhalb kürzester Zeit prozessiert werden. Die Testzeit soll unter 30 Minuten liegen, so dass das Gerät POCT-Kriterien erfüllt. Der Zeitaufwand für das Testformat, welches ohne Gerät prozessiert wird, beträgt ca. drei Stunden, d. h. die Testzeit muss drastisch reduziert werden. Zusätzlich soll die Fluidik-Einheit aus wenigen Komponenten aufgebaut sein, mit wenigen Mikrolitern Probenvolumen auskommen und muss vielzählige Funktionen beinhalten, um die Tests prozessieren zu können. Dazu gehören z. B. exaktes Dosieren weniger Mikroliter, Mischen, Verdünnen, Vorinkubation und Inkubation.

Eine weitere, essentielle Voraussetzung für ein POCT-System sind akkurate Testergebnisse. Diese Ergebnisse sollen im Rahmen der Vorschriften von validierten Methoden liegen, wie z. B. die Vorgabe der FDA „Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation“ [14] oder der Richtlinie der Bundesärztekammer [15]. Das bedeutet unter anderem die Einhaltung der Präzision und Genauigkeit unter vorgeschriebener Berechnung. Diese Grenzwerte sollen durch die Etablierung spezieller Methoden innerhalb der Mikroarrays erreicht werden, die das Testsignal korrigieren und so akkurat werden. Im Rahmen der Arbeit sollen so unterschiedliche Methoden getestet werden.

Die Ansprüche der beschriebenen Testzeit und die Einhaltung der Regularien für akkurate Testergebnisse auf Basis von Protein-Mikroarrays sind eine Herausforderung. Hierbei muss der derzeitige Stand der Technik deutlich überschritten werden.

II Theoretische Grundlagen

3 Biotechnische und Biochemische Grundlagen

3.1 Antigene und Antikörper

Substanzen, die die Bildung von Antikörpern hervorrufen, werden Antigene (Kunstwort: *anti*body *gen*erating) bzw. Immunogene genannt. Daher können Antigene verschiedenste Moleküle wie z. B. Proteine, Polysacharide oder Glycolipide sein. Da sich die genannten Molekülgruppen auch auf der Oberfläche von Viren oder Bakterien befinden, lösen diese Erreger auch die Immunantwort aus. Generell wird eine Immunantwort durch einen vom Körper erkannten Fremdstoff ausgelöst. Bei der humoralen Immunantwort werden Antikörper gebildet, auch Immunglobuline (Ig) genannt, die eine Klasse von Proteinen repräsentieren. Sie werden von B-Lymphozyten, die zu den weißen Blutkörperchen zählen, im Knochenmark gebildet. Im Körper befinden sich davon mehr als 10^9 verschiedene spezifische Rezeptoren. Nach dem Freisetzen der Antikörper besteht ihre Aufgabe darin, Fremdkörper zu erkennen, zu markieren oder angreifbar zu machen. Entweder werden die Fremdkörper durch die Anbindung inaktiviert, aggregiert und von Phagozyten lysiert oder durch Markierung von speziellen Plasmaproteinen des Komplementsystems zerstört. Die dafür verantwortlichen Regionen des Antikörpers sind in Abb. 1 markiert. Immunglobuline können in fünf verschiedene Isotypen eingeteilt werden: IgM, IgG, IgA, IgE und IgD. Das IgG kommt dabei am häufigsten vor und ist auch die Grundlage aller verwendeten Antikörper, die noch in späteren Abschnitten der Arbeit angewendet werden.

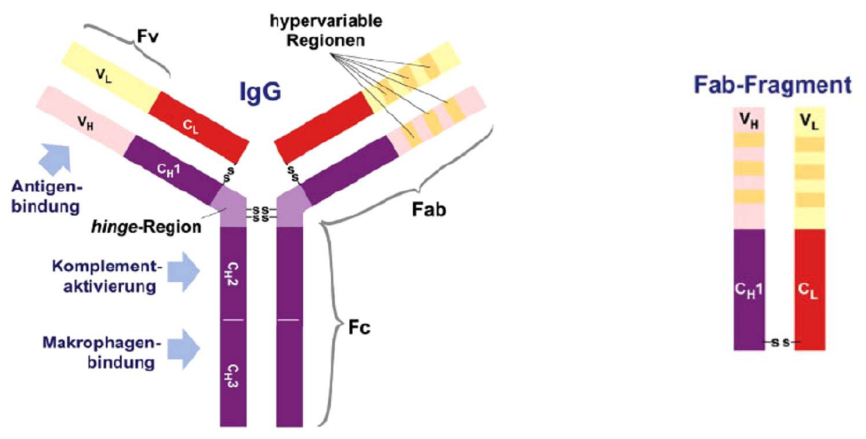


Abb. 1 Immunglobulin G [16]

Aufbau des Immunglobulins G (IgG) mit Unterteilung der verschiedenen Fragmente nach Variabilität und Gewicht. So steht „V“ für variabel, „C“ für konstant, „H“ für schwer, „L“ für leicht, „Fab“ für antibody binding Fragment, und „Fc“ für constant binding Fragment.

Das IgG (siehe Abb. 1) weist ein Molekulargewicht von 150 kDa auf. Es ist aus zwei identischen leichten Ketten mit je 25 kDa aus 220 Aminosäuren und zwei identischen schweren Ketten mit je 50 kDa aus ca. 440 Aminosäuren aufgebaut. Die leichte Kette besteht aus der konstanten C_L Region am C-Terminus und der variablen V_L Region am N-Terminus der Kette. Die schwere Kette besteht aus den drei konstanten Regionen C_H1-3 und der variablen Region V_H. Die zwei Ketten sind durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden. Das Fab-Fragment setzt sich aus der konstanten Region C_H1 und C_L mit der variablen Region F_V bestehend aus V_H und V_L zusammen. Die F_V Region ist für die spezifische Bindung der Antigene verantwortlich, die Bindungsstelle nennt sich Paratop, das Äquivalent auf dem Antigen nennt sich Epitop. Da die zwei Paratope auf dem Antikörper identisch sind, nennt man die Bindungsstellen bivalent. Innerhalb von V_H und V_L liegen jeweils drei hypervariable Regionen die sich „complementary determining regions“ nennen und aus jeweils ca. 50 Aminosäuren bestehen. Im Gegensatz zu den variablen Regionen, ist das Fc-Fragment aus den zwei konstanten Ketten C_H2 und C_H3 aufgebaut und somit auf jedem IgG identisch. Zwischen C_H1 und C_H2 befindet sich der Knick (Hinge-Region), der dem Antikörper die typische Y-Form verleiht. [9; 16-19]

Antikörper können sowohl polyklonal als auch monoklonal für Immun-Tests eingesetzt werden. Monoklonale Antikörper werden in speziellen Verfahren hergestellt. Polyklonale Antikörper sind eine Mischung aus verschiedenen Antikörpern mit unterschiedlicher Spezifität sowie differierenden Isotypen und Paratopen. Für die Gewinnung dieser Antikörper dient oft ein Hase oder ein vergleichbares Labortier. Das Tier wird einem Immunogen durch Injektion ausgesetzt und produziert so Antikörper, die nach geraumer Zeit durch Blutentnahme erhalten werden können. Die Antikörper können bei Bedarf durch geeignete Methoden, wie z. B. Dialyse oder Gelfiltration, aufgereinigt werden. Monoklonale Antikörper werden durch Hybridomazellen hergestellt. Hierbei handelt es sich um eine fusionierte Zelle aus B-Lymphozyten und den krebsartigen Myelomzellen. Die beiden Eigenschaften der zwei Zelltypen verbinden sich in der Hybridomzelle, so kann sie spezifische Antikörper produzieren, lässt sich gut kultivieren und vermehrt sich schnell. Auf diese Weise produzierte Antikörper sind identisch, da ein einzelner B-Lymphozyt ausschließlich in der Lage ist nur einen speziellen Antikörper zu bilden. [20]

3.2 Biochips

Biochips zeichnen sich durch die Kapazität einer hochparallelen Messung vieler Analyten aus. Die Technologie liefert durch starke Miniaturisierung die Grundlage für die Durchführung von Reaktionen auf Basis von Biomolekülen, wie DNA, Peptiden oder Proteinen. Diese werden hierzu auf einem festen Träger (Chip) in einem festen Raster (Mikroarray) immobilisiert. Im Allgemeinen sind die Biomoleküle in Flüssigkeiten gelöst, welche in Form kleinster Tropfen auf das feste Substrat gebracht werden, die als Mikrospot bezeichnet werden. Das Spotvolumen beträgt nur wenige Nanoliter und

hängt von der Viskosität, Oberflächenbeschaffenheit des Chips, Luftfeuchtigkeit und Temperatur ab. Vorteil der Technologie ist, dass das Array aus mehreren hunderten bis tausenden Mikrospots bestehen kann, wobei das benötigte Volumen und die Fläche sehr klein sind. Zusätzlich kann theoretisch jeder einzelne dieser Mikrospots ein spezielles Biomolekül enthalten, das spezifisch mit einem Analyten reagiert, solche Moleküle werden auch Sonden genannt. So entsteht eine parallele Hochdurchsatzmessung. Prinzipien für solche Reaktionen sind in Kapitel 3.5 beschrieben. [21]

Es gibt verschiedene Technologien zum Aufbringen der Biosonden, wobei die Geräte als Spotter bezeichnet werden. Die Geräte lassen sich in Kontakt-Spotter und Kontaktlose-Spotter unterteilen. Der Kontakt-Spotter hat direkten Kontakt zum Substrat, dabei wird eine Nadel in das Fluid mit den gelösten Biosonden getaucht und anschließend auf dem Chip abgesetzt. Die Nadel, auch Pin genannt, kann massiv oder mit einer Kapillare versehen sein und ist meist aus Stahl, Wolfram oder Titan hergestellt. Massive Nadeln werden als Solid-Pins bezeichnet, generell muss nach jeder Tropfenabgabe neu eingetaucht werden. Kapillare Nadeln werden als Split-Pins bezeichnet, welche einen kapillaren Spalt als Reservoir mit bis zu 400 µl Volumen nutzen. Daher kann eine solche Nadel mehrmals nach dem Auftanken Tropfen abgeben. Die meist abgeflachte Fläche an der Spitze der Nadel variiert zwischen 75-375 µm und bestimmt mitunter den Spotdurchmesser.

Kontaktlose-Spotter können die Tropfen durch z. B. druckgesteuerte Düsen auf die Oberfläche schießen, ähnlich wie ein Tintenstrahldrucker. Dabei hat die Düse keinen Kontakt zum Substrat, was oft von Vorteil sein kann, da das Substrat nicht mechanisch beschädigt werden kann. Um einem Tropfen durch die meist piezoelektrisch gesteuerten Düsen abgeben zu können, muss die Oberflächenspannung σ der Substanz durch ausreichende Stoßgeschwindigkeit v überwunden werden, um einen Tropfenabriss zu erzeugen. Bei zu langsamer Stoßgeschwindigkeit würde sich der Tropfen wieder in die Düse zurückziehen. Mit der dimensionslosen Ohnesorg-, Weber- und Reynolds-Zahl kann die Geschwindigkeit, die zur Tropfenabgabe führt, berechnet werden. Hierbei werden die dynamische Viskosität η, die Fluiddichte ρ und der Öffnungsdurchmesser der Düse d_n berücksichtigt. Die Ohnesorg-Zahl On lässt sich aus der dimensionslosen Weber-Zahl We, die die Oberflächenspannung und kinetische Energie in Verbindung bringt, und der Reynolds-Zahl Re, die ein Verhältnis aus kinetischer Energie und Reibungsenergie ist, berechnen:

Gleichung 1 Tropfenabgabe [22]

$$On = \frac{\sqrt{We}}{\mathrm{Re}} = \frac{\eta}{\sqrt{\rho\, d_N\, \sigma}}$$

mit

$$We = \frac{E_{kin}}{\sigma} = \frac{\rho\, d_N\, v^2}{\eta}$$

und

$$\mathrm{Re} = \frac{E_{kin}}{E_{reib}} = \frac{\rho\, l\, v}{\eta}$$

zu

$$v_{krit} = \sqrt{\frac{We_{krit} \cdot \sigma}{\rho \cdot d_N}}$$

On = Ohnesorg-Zahl [ ]
We = Weber-Zahl [ ]
Re = Reynolds-Zahl [ ]
η = Viskosität [kg/m s]
d_N = Öffnungsdurchmesser der Düse [m]
ρ = Fluiddichte [kg/m^3]
σ = Oberflächenspannung [kg/s^2]
E_{kin} = Kinetische Energie [J]
E_{reib} = Reibungsenergie [J]
l = Kanaldurchmesser [m]
v = Fließgeschwindigkeit [m/s]
v_{krit} = Kritische Fließgeschwindigkeit [m/s]
We_{krit} = Kritische Weber-Zahl [12]

Wird die kritische Weber-Zahl We_{krit} = 12 überschritten, kann die kritische Fließgeschwindigkeit v_{krit} berechnet werden, bei der ein Tropfen abgeben wird.

Für Kontakt- und Kontaktlose-Spotter befindet sich der Druckkopf, an dem sich die Düsen bzw. die Nadeln befinden, an einem X-Y motorisierten Translationssystem. Dieses Translationssystem positioniert somit das Array. An dem Kopf können je nach Spotter bis zu 64 Nadeln oder 96 Düsen angebracht sein. Das System muss auf Grund der miniaturisierten Fertigung sehr genau positionieren können. Speziell bei Nadel-Spottern sind sehr häufig Waschstationen implementiert, um Kontaminationen zu minimieren. Durch die vorgestellten Techniken lassen sich auf diese Weise Mikroarrays mit bis zu 200 000 Spots/cm^2, mit Spotvolumina kleiner einem Nanoliter und Spotdurchmessern von 100-500 Mikrometern herstellen. [21; 23; 24]

3.3 Oberflächenfunktionalisierung für Biochips

Die Immobilisierung von Biosonden an eine Oberfläche ist eine grundlegende Voraussetzung für die Herstellung eines Biochips. Besonders im Bereich der DNA-Biochips hat sich diese Technologie schon sehr weit entwickelt und wird konventionell eingesetzt. Ein Grund hierfür ist das stark gefächerte Spektrum, das die Biochiptechnologie abdecken kann. Generell ist es vorteilhaft die Biomoleküle spezifisch an die Oberfläche zu binden. Unspezifische Bindungen setzen zwar nicht unbedingt die Funktionalität außer Kraft, jedoch kann die Reproduzierbarkeit der Signale unter den schwankenden Bedingungen von z. B. adsorptiven Bindungen leiden. Gerade für Anwendungen der Diagnostik ist daher eine spezifische und kovalente Immobilisierung zu bevorzugen. Eine verbreitete Technik hierzu ist die Reaktion von funktionellen und reaktiven Gruppen mit der Sonde. Die gängigen Gruppen sind hierbei Aldehyde, N-Hydroxysuccinimid Ester, Maleimide, Thiole, Isothiocyanate und Epoxide. Letztere kommt in der vorgestellten Arbeit zum Einsatz und wird daher im Folgenden genauer erklärt.

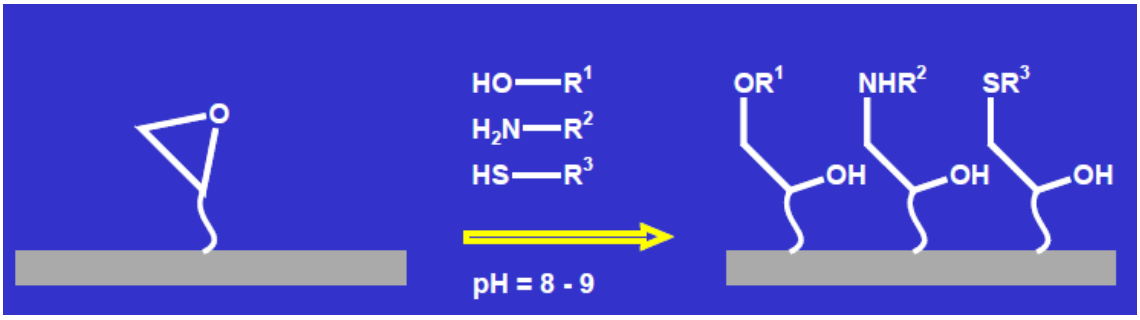


Abb. 2 Anbindung von Epoxid-Gruppen an eine Oberfläche [19]

Unter Aufspaltung des Epoxidrings werden die reaktiven Gruppen Alkohol (-OH), Amin (-NH_2) und Thiol (-SH) durch eine Additionsreaktion kovalent an die Oberfläche gebunden.

Funktionelle Anbindung mit Epoxiden ist eine weitverbreitete Methode für die Modifizierung planarer Oberflächen, kommerziell erhältliche Epoxid-Objektträger für Forschungsanwendungen sind zahlreich erhältlich. Der Abb. 2 ist zu entnehmen, dass es sich bei Epoxiden um eine hochreaktive, zyklische Gruppe handelt. Bei der Reaktion öffnet sich der Ring. Reaktionspartner für die Additionsreaktion können Alkohole, Thiole und Amine sein. Da Proteine neben dem N-Terminus auch andere zugängige Amin-Reste aufweisen, können diese ohne zusätzliche Modifizierung angebunden werden. [19; 25; 26]

Die in der Arbeit verwendete Oberflächenfunktonalisierung mit Epoxid basiert auf der Technologie des Austrian Institute of Technology [27]. Hier wird beschrieben, dass die Anzahl der Epoxid-Gruppen weder zu niedrig noch zu hoch sein darf. Zu niedrige Funktionalität minimiert die Immobilisierungskapazität der Oberfläche. Da meistens hohe Signale vorteilhaft sind, ist eine hohe Immobilisierungsdichte der Sonden gewünscht. Ab einem gewissen Punkt führt eine Überfunktionalisierung des Epoxids dazu, dass die reaktiven Gruppen miteinander reagieren und so ein Anbinden von Sondenmolekülen nicht mehr möglich ist. Das Optimum der Funktionalität des verwendeten Epoxids liegt bei acht Gruppen pro Monomer. Das Polymer ist aus Bisphenol A (2.2-Bis (4-hydroxyphenyl) Propan, $C_{15}H_{16}O_2$) aufgebaut.

3.4 Analyse von Biochipsignalen

In diesem Kapitel wird erklärt, wie die Signale auf einem Biochip analysiert werden. Hierzu werden die Charakteristika für die Kurvendiskussion von Dosis-Wirkungs-Kurven erklärt. Im nachfolgendem Kapitel 3.5 wird die Entstehung der Signale, welche zur Dosis-Wirkungs-Kurve führt, beschrieben. Dosis-Wirkungs-Kurven von Immun-Tests weisen typischerweise einen sigmoidalen Verlauf auf. Wenn für die Erhaltung einer Dosis-Wirkungs-Kurve eine Messreihe mit einem standardisierten Analyt, also ein Analyt in bekannter Konzentration, zugegeben wird, spricht man von einer Standardkurve. Durch die Aufnahme von Standardkurven kann das verwendete Messsystem validiert werden. Aus der Richtlinie der FDA „Bioanalytical Method Validation“ [14]

werden grundsätzliche Vorgehensweisen für die Validierung beschrieben. Nach der Durchführung dieser Prozedur erhält man durch Fitten der Datenpunkte die sigmoidale Funktion mit:

Gleichung 2 4-Parameter-Logistik-Fit [28]

$$y = \frac{A - D}{1 + (x/C)^B} + D$$

und

$$x = C \cdot \left(\frac{A - D}{y - D} - 1 \right)^{\frac{1}{B}}$$

y = Signal
A = Signal untere Sättigung
B = Steigungsfaktor
C = Mittenpunkt
D = Signal obere Sättigung
x = Konzentration

Für Immun-Test-Signale weist die Kurve bei einem nicht-kompetitiven Test (siehe Kapitel 3.5.5, S. 15) eine S-Form auf mit oberer und unterer Sättigung A und D. Der Mittenpunkt C weist die Konzentration bei halber Signalstärke des Maximums auf, also die halbe Intensität y = D/2. Der Steigungsfaktor B bestimmt die Steilheit der Kurve. Für bindungsinhibitierende und kompetitive Tests (siehe Kapitel 3.5.4, S. 13) ist die Kurve lediglich mit oberer und unterer Sättigung vertauscht. Nach Erhalt der Messwerte kann die Formel nach x aufgelöst werden und man erhält die zum aufgenommenen Signal y korrespondierende Konzentration x.

Für die Bestimmung der Kenngrößen der Standardkurven durch den Fit schlägt die FDA folgende Messungen vor:

- Messung der Nullprobe (y_0) mit mind. drei Replika.
- Sechs bis acht Messungen für Analytkonzentrationen über der unteren Quantifizierungsgrenze (LLOQ) innerhalb des zu erwartenden Messbereichs mit jeweils mind. drei Replikatsmessungen; inklusive der Sättigung.

Als Nullprobe wird eine Messung in Anwesenheit aller Detektionsmoleküle bezeichnet, die aber ohne Analyt durchgeführt wird. Nun können aus der Nullprobe und anhand der anderen Replikatsmessungen folgende Charakteristika berechnet werden:

Tabelle 1 Definition und Berechnung der Charakteristika

Mittelwert $\bar{x}_c$ von n Replika bei der Konzentration c ($c = 1...m$)	$\bar{x}_c = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_{c,i}}{n}$
Standardabweichung σ_{xc} von n Replikaten bei der Konzentration c ($c = 1...m$)	$\sigma_{x_c} = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}\left(x_{c,i} - \overline{x_c}\right)^2}$
Unpräzision	$Unpräzision = \frac{\sigma_{xc}}{\bar{x}_c} \cdot 100\%$
Unrichtigkeit	$Unrichtigkeit = \left(\frac{\overline{x_c}}{WahrerWert_c} - 1\right) \cdot 100\%$
Mittelwert der Nullprobe $\bar{y}_0$	$\bar{y}_0 = \frac{\sum_{i=1}^{n} y_{0,i}}{n}$
Standardabweichung der Nullprobe σ_{y_0}	$\sigma_{y_0} = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}\left(y_{0,i} - \overline{y_0}\right)^2}$
Detektionsgrenze LOD	$LOD = C \cdot \left(\frac{A-D}{(\bar{y}_0 + 3 \cdot \sigma_{y_0}) - D} - 1\right)^{\frac{1}{B}}$
Untere Quantifizierungsgrenze LLOQ	$LLOQ = C \cdot \left(\frac{A-D}{(\bar{y}_0 + 10 \cdot \sigma_{y_0}) - D} - 1\right)^{\frac{1}{B}}$
Obere Quantifizierungsgrenze ULOQ	Höchste Konzentration, bei der Unpräzision und Unrichtigkeit noch unter 15 % liegen.
Dynamischer Messbereich	$Dekaden = \log\left(\frac{ULOQ}{LLOQ}\right)$

Durch die Messung der Nullprobe y_0 kann das Detektionslimit LOD bestimmt werden. Es gibt an, welches die minimal zu detektierende Konzentration ist. Zusätzlich wird so die untere Quantifizierungsgrenze LLOQ bestimmt, die festlegt ab welcher Konzentration das System in der Lage ist quantitativ zu messen. Somit wird LOD und LLOQ durch das Signal der Nullprobenmessungen und dessen Streuung σ_{y_0} bestimmt. Die obere Quantifizierungsgrenze gibt an, welche die höchste quantitativ messbare Konzentration des Analyten ist, die sich auf Grund der oberen Sättigung der sigmoidalen Kurve ergibt. Die Unpräzision gibt an, wie groß die Streuung der Replikatsmessungen ist. Die Unrichtigkeit gibt die Abweichung des Mittelwerts der Replikate zum Kurven-

Fit an, sie wird auch oft als Ungenauigkeit bezeichnet. Unpräzision und Unrichtigkeit beziehen sich auf die berechneten Konzentrationswerte x und nicht auf das Signal y.

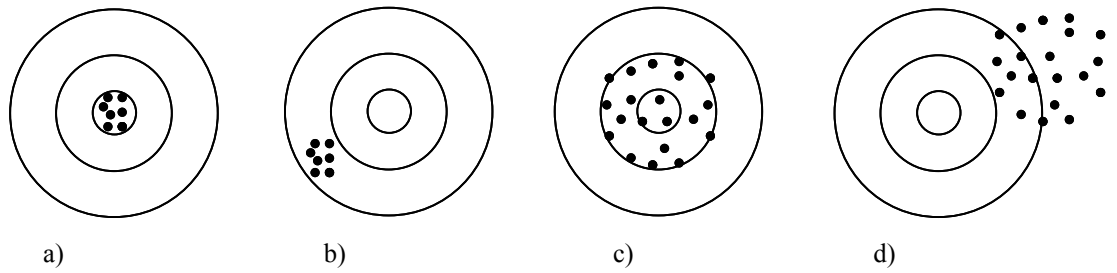


Abb. 3 Fallbeispiele für Unpräzision und Unrichtigkeit
a) Geringe Unpräzision und geringe Unrichtigkeit
b) Geringe Unpräzision und hohe Unrichtigkeit
c) Hohe Unpräzision und geringe Unrichtigkeit
d) Hohe Unpräzision und hohe Unrichtigkeit

In Abb. 3 ist die Unpräzision und Unrichtigkeit veranschaulicht. Der Mittelpunkt der Zielscheibe entspricht dem wahren Wert der Konzentration des Analyten bzw. der ermittelten Fitfunktion: $WahrerWert_c$. Die schwarzen Punkte entsprechen einer Einzelmessung einer Konzentration mit einem System. Das Ziel ist, eine Reihe von Messdaten zu erhalten wie in a) dargestellt. Hier ist eine geringe Unpräzision und Unrichtigkeit gegeben. In b) weisen die Messwerte kleine Streuungen auf, aber vom Mittelpunkt der Zielscheibe verschoben. Also wird hier geringe Unpräzision, aber eine hohe Unrichtigkeit erreicht. In c) haben die Messungen ein hohe Unpräzision, also stark streuende Einzelmessungen. Aber der Mittelwert dieser Messungen befindet sich im Mittelpunkt der Zielscheibe, also haben sie eine geringe Unrichtigkeit. Der Fall d) ist unpräzise und unrichtig. Unpräzision und Unrichtigkeit sollen hierbei unter 15 % liegen, wobei 0 % das Optimum ist. Die Bundesrichtlinie der deutschen Ärztekammer gibt für klinisch etablierte Parameter spezielle Grenzen für Unpräzision und Unrichtigkeit an. Hierzu gehört das CRP, das mit unter 8 % Unpräzision und 11 % Unrichtigkeit als valid anzusehen ist.

Für die sogenannte Wiederbestimmungsrate werden die Versuche äquivalent zur Generierung der Standardkurven durchgeführt. Hierbei werden die Probe und Detektionsantikörper jedoch nochmals frisch angesetzt und der Versuch wiederholt. Durch diese Methode wird die Messung einer unbekannten Probe nachempfunden. Es werden für eine positive Wiederbestimmungsrate häufig die Werte für Unpräzision und Unrichtigkeit < 20 % angegeben. In der Literatur sind auch akzeptierte Grenzwerte mit < 30 % zu finden [29].

3.5 Formate von Immun-Tests

Als Immun-Test wird die Prozessierung z. B. eines Biochips mit Proben, Waschsubstanzen und anderen benötigten Reagenzien bezeichnet, um einen Analyten quantitativ mit Hilfe von Antikörpern nachzuweisen. Der Analyt ist ein Antigen oder aber auch ein Antikörper. Für die Detektion gibt es hierfür verschiedene Techniken. Als markierungsfrei werden Methoden bezeichnet, bei denen die Antikörper nicht modifiziert werden müssen, um sie detektieren zu können. Im Gegensatz hierzu stehen markierte Antikörper. Die Markierung kann ein Enzym, ein Fluorochrom, ein Farbstoff, ein Nanopartikel oder radioaktive Isotopenmarkierung sein. Um den Immun-Test selbst aufzubauen, gibt es verschiedene Methoden, die im Folgenden erklärt werden. Zusätzlich wird die Prozessierung in Bezug auf die Fluidik-Einheit, die klinischen Parameter der Sepsis und die mit Fluoreszenz markierten Antikörper erläutert. [20]

3.5.1 Antigen-Antikörper-Bindung

Beim Anbinden des Antigens an den Antikörper zeigt das Massenwirkungsgesetz eine Gleichgewichtsreaktion:

Gleichung 3 Massenwirkungsgesetz [20]

$$[Ag]+[Ak] \xleftrightarrow{ka,kd} [Ag-Ak]$$

und

$$K_{eq} = \frac{k_a}{k_d}$$

Ag = Antigenkonzentration
Ak = Antikörperkonzentration
K_{eq} = Equilibriumskonstante
k_d = Dissoziationskonstante
k_a = Assoziationskonstante

Die Reaktionsgeschwindigkeit selbst hängt neben der Geometrie der Reaktionskammer (siehe Kapitel 4.6.1) von der Temperatur, dem pH-Wert und der Ionenstärke ab. Die Dissoziationskonstante k_d und die Assoziationskonstante k_a geben an, wie stark die Bindung aufrecht gehalten wird. Gerade nach dem üblichen Waschen nach einer Reaktion spielt dies eine große Rolle. Das Gleichgewicht sollte stark auf der Seite der Bindung liegen, also bei einer hohen Assoziationskonstante k_a, da sonst die Bindung auf Grund der niedrigen Konzentrationen [Ag]+[Ak] wieder gelöst wird. Für optimale Inkubation gibt das Verhältnis k_a zu k_d die Equilibriumskonstante K_{eq} (das Gleichgewicht der Reaktion) an. Unter Inkubation versteht man den Vorgang, bei dem Antigen und Antikörper Zeit zur Reaktion haben. Für Endpunktsreaktionen wird die Zeit abgewartet, bis alle möglichen Reaktionen stattgefunden haben und sich die Reaktion im Gleichgewicht befindet; zu diesem Zeitpunkt wird dann das Messsignal aufgenommen. [20]

Der Begriff Affinität gibt an, wie stark die Bindung zweier Moleküle, also die Assoziationskonstante k_a ist. Avidität bezeichnet die Summe aller Affinitäten. Im Falle der Antigen-Antikörper-Bindung ist die Avidität gleich der Affinität, da sich nur ein Epitop mit einem Paratop verbindet. [18]

3.5.2 Indirekter Test

Für diese Art Test wird ein Antikörper nachgewiesen. Für die Diagnose einer Sepsis ist dieses Format nicht verwendbar. Dennoch soll diese gängige Methode, die z. B. für den Nachweis des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) zum Einsatz kommt, kurz erklärt werden. Das Substrat ist in diesem Fall mit dem Antigen beschichtet, durch Zugabe der Patientenprobe reagieren, wenn vorhanden, die Antikörper und binden sich an die Oberfläche. In einem zweiten Inkubationsschritt wird der Detektionsantikörper zugegeben, der nur mit dem Patienten-Antikörper reagieren kann. So wird aufgezeigt, ob der Patient gegen das sich im Körper befindliche Antigen Antikörper gebildet hat, was die Krankheit nachweist. [20; 30]

3.5.3 Direkter Test

Beim direkten Test wird das Antigen immobilisiert, welches auch ein Antikörper sein kann. Ein markierter Antikörper wird in der mobilen Phase zugegeben und reagiert so direkt mit dem Antigen [9; 18], wie in Abb. 4.

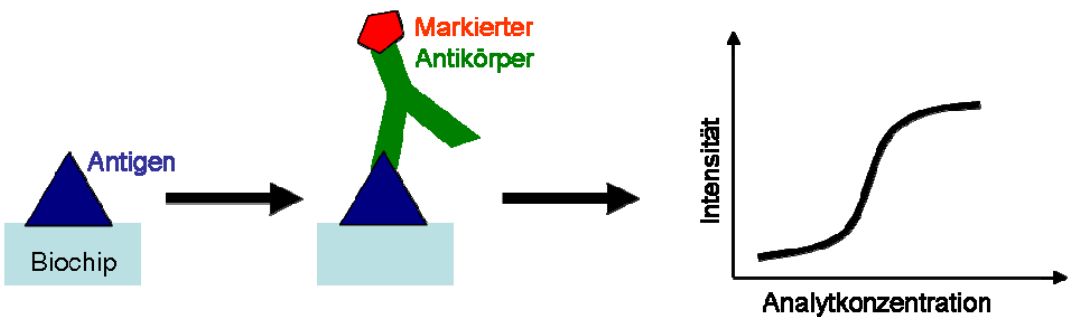


Abb. 4 Schema direkter Test

Bei diesem Test ist der Analyt ein Antikörper, welcher vor dem Test für die Detektion markiert werden muss. Der Test besteht aus einer Inkubationsphase. Der Signalverlauf der Intensität ist mit zunehmender Antigenkonzentration innerhalb der oberen und unteren Sättigung zunehmend.

In diesem Fall ist der Analyt der Antikörper. Herausstechend ist, dass der Analyt markiert werden muss. Der Signalverlauf der Intensität ist mit ansteigender Analytkonzentration innerhalb der oberen und unteren Sättigung zunehmend. Der auf diese Weise aufgetragene Zusammenhang zwischen Analytkonzentration und Intensität wird auch Dosis-Wirkungs-Kurve genannt. Dieser Test kommt für den Nachweis von Antikörpern bei der Immunantwort eines Antigens zur Anwendung. Für die Diagnostik einer Sepsis findet dieser Test keine Anwendung. Jedoch wird diese Art von Test für die Referenz-

reaktion in dieser Arbeit verwendet, siehe Kapitel 17.1 “Reaktion und Signalaufnahme“. Hierbei sind die Antigene polyklonale Antikörper aus Hasen und der markierte Antikörper ist monoklonal und reagiert spezifisch mit Antikörpern von Hasen.

3.5.4 Kompetitive- und Bindungsinhibitions-Tests

Als Kompetitor werden Moleküle bezeichnet, die an die gleiche Bindungsstelle des Antikörpers greifen wie der Analyt. Somit konkurrieren Analyt und Kompetitor um den Reaktionspartner. Beim kompetitiven Test ist die Menge des markierten Kompetitors limitiert und konstant einzustellen. So auch die Konzentration des Detektionsantikörpers beim Bindungsinhibitions-Test. Generell muss die Konzentration der Detektionssonden unter der des Analyten liegen, darf aber auch nicht zu niedrig eingestellt werden, da sonst keine brauchbare Dosis-Wirkungs-Kurve entsteht. Bei beiden Formaten wird die Probe mit den limitiert vorhandenen, markierten Detektionssonden gemischt. Dies impliziert, dass für diesen Test das Mischen und die verwendeten Mengen der Probe und der Detektionsantikörper akkurat gehandhabt werden müssen. In Abb. 5 ist der Aufbau und die Dosis-Wirkungs-Kurve des Bindungsinhibitions-Tests zu sehen. Hier wird das Antigen, in diesem Fall der Analyt, auf dem Chip immobilisiert, während die Antigene der Probe mit einem limitiert vorhandenen markierten Antikörper gemischt werden. Dies geschieht fern vom Chip und wird deshalb als Vorinkubation bezeichnet. Wenn Antigene mit dem Antikörper reagieren, ist die Bindungsstelle blockiert und der Antikörper ist nicht mehr in der Lage auf dem Chip zu reagieren. Aus diesem Grund nimmt die Dosis-Wirkungs-Kurve mit zunehmender Analytkonzentration ab.

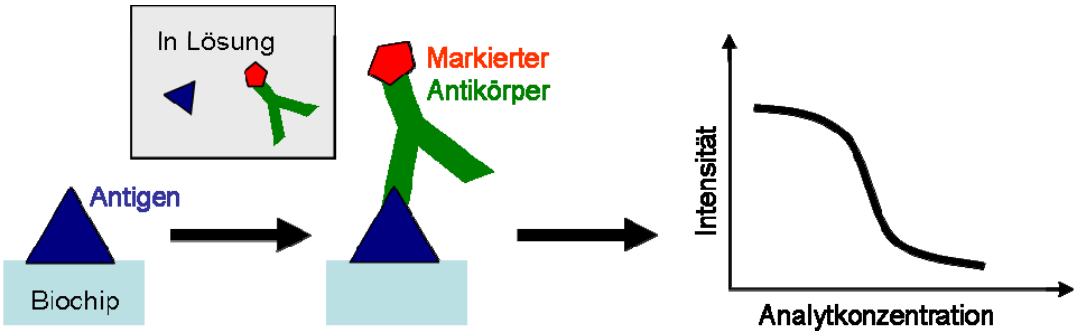


Abb. 5 Schematischer Aufbau Bindungsinhibitions-Tests

Die markierten Antikörper werden mit den Antigenen der Probe in Lösung vorinkubiert. Die Antigene sind der Analyt. Die Intensität des Signals der Dosis-Wirkungs-Kurve nimmt mit zunehmender Analytkonzentration innerhalb der oberen und unteren Sättigung ab. Reagierte markierte Antikörper sind blockiert und können so nicht mehr auf dem Chip anbinden.

Beim kompetitiven Test ist der Kompetitor ein markiertes Antigen. Dieses wird meist künstlich hergestellt, markiert und steht somit vor der Entnahme einer Probe des Patienten zur Verfügung, welche als Analyt das unmarkierte Antigen enthält. Auf den Chip gebracht reagiert eine Mischung der Probe aus markierten Antigenen und den Antigenen der Probe mit den Antikörpern auf dem Chip, wie in Abb. 6 zu sehen ist. Nun ent-

scheidet das Mischungsverhältnis über den Signalverlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve. Da die Anzahl der markierten Antigen wieder konstant und limitiert eingestellt ist, gilt: Je mehr unmarkierte Antigene der Probe vorhanden sind, desto kleiner die Intensität des Messsignals. Limitierungen des kompetitiven Tests liegen hauptsächlich an der Tatsache, dass das Antigen markiert werden muss, ohne dabei die Funktion der Bindungsstellen zu stören.

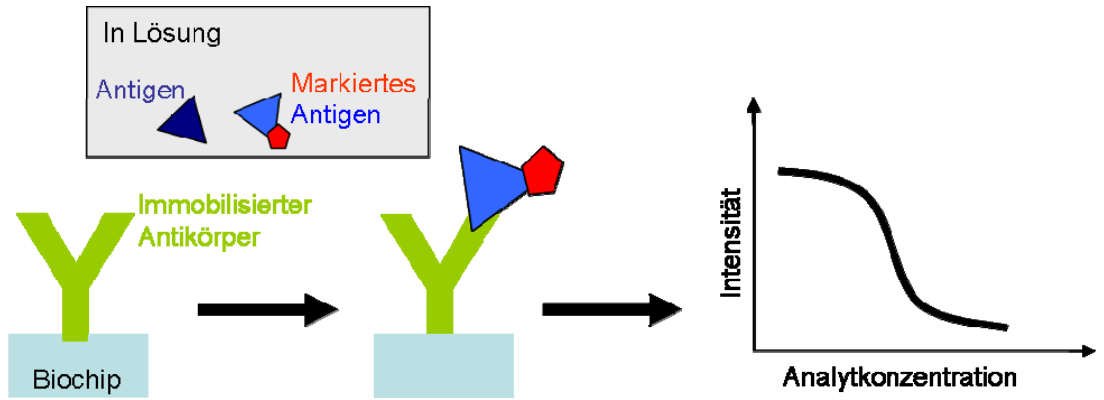


Abb. 6 Schematischer Aufbau kompetitiver Test

Die in Lösung mit den markierten Antigenen gemischten Antigene reagieren auf dem Chip. Das unmarkierte Antigen ist der Analyt. Die zwei Typen von Antigenen konkurrieren um die freien Bindungsstellen. Je mehr unmarkierte Antigene in der Probe im Vergleich zu den markierten vorhanden sind, desto wahrscheinlicher wird deren Anbindung. Daher nimmt die Intensität des Signals der Dosis-Wirkungs-Kurve mit zunehmender Analytkonzentration ab.

Das Neopterin (Kapitel 5.1.3) ist ein sehr kleines Molekül und bietet deshalb nur Platz für einen Antikörper. Eine zweite Bindungsstelle ist somit sterisch blockiert. Deshalb kommt für diesen klinischen Marker nur ein kompetitives oder bindungsinhibitierendes Format in Frage. Da bei beiden Formaten nur ein Inkubationsschritt auf dem Chip notwendig ist, ist die Testzeit kurz. Die Vorinkubation fern vom Chip läuft im Allgemeinen schnell ab, da sich die Moleküle in Lösung befinden und so der Reaktionspartner durch Diffusion in allen Raumrichtungen frei ablaufen kann und nicht wie beim Chip auf zwei Dimensionen begrenzt ist.

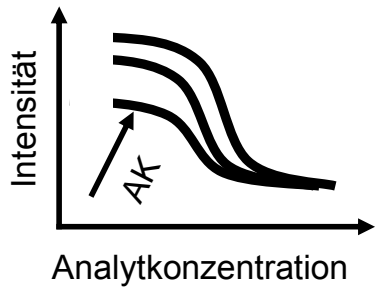


Abb. 7 Einstellung des Messbereichs

Mit zunehmender Antikörperkonzentration AK wird die Dosis-Wirkungs-Kurve des Bindungsinhibitions-Tests steiler und deckt den Messbereich in höherer Analytkonzentration ab.

Der Kurvenverlauf der Testformate ist zu einem gewissen Grad einstellbar. Am Beispiel des Bindungsinhibitions-Tests in Abb. 7 ist zu sehen, dass mit zunehmender Konzentration des markierten Antikörpers AK der Signalverlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve steiler wird und dafür der dynamische Messbereich reduziert wird, welcher jedoch nun die Messung hoher Analytkonzentrationen möglich macht. Dasselbe gilt, wenn die Antikörperkonzentration konstant bleibt, aber dafür die Assoziationskonstante des Antikörpers zunimmt. Somit kann bei diesem Testformat Einfluss auf den Messbereich des Analyten genommen werden. [20]

3.5.5 Nicht-kompetitiver Test

Der nicht-kompetitive Test wird häufig auf Grund seines Aufbaus auch Sandwichassay genannt. Hier wird ein Antikörper auf der Oberfläche immobilisiert, der den Analyten binden kann. Der Analyt ist ein Antigen. Dieses kann nun in der mobilen Phase zugeführt werden und reagieren. In einem zweiten Inkubationsschritt wird der markierte Detektionsantikörper immobilisiert. Wichtig ist, dass die zwei Antikörper unterschiedliche Bindungsstellen am Antigen haben und diese weit genug auseinander liegen, da sonst die zweite Reaktion sterisch blockiert wäre.

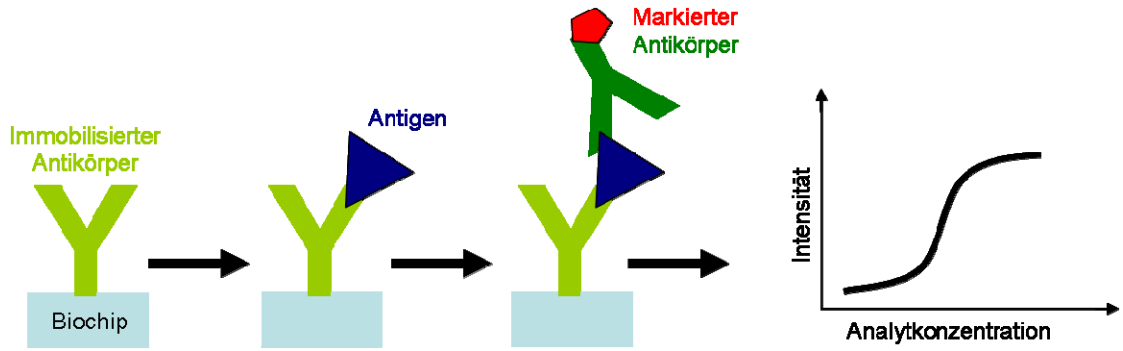


Abb. 8 Nicht-kompetitiver Test

Schematischer Aufbau mit zwei Inkubationsschritten für jeweils die Antigene und die markierten Detektionsantikörper. Die Antigene sind der Analyt. Die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt innerhalb der oberen und unteren Sättigung mit zunehmender Analytkonzentration ein zunehmendes Signal auf.

Das Signal des Tests ist hierbei innerhalb der oberen und unteren Sättigung mit steigender Analytkonzentration zunehmend, wie in Abb. 8 zu sehen. Die Konzentrationen der zwei Antikörper sind im Verhältnis zum Antigen stark überschüssig. Diese Art von Test zeichnet sich durch sehr hohe Sensitivität aus. Die klinischen Parameter Interleukin-6

und Procalcitonin (Kapitel 5.1.3) werden in diesem Format gemessen. Da bei diesem Test zwei Inkubationsschritte notwendig sind, ist die Testzeit generell länger. Im Allgemeinen hat der nicht-kompetitive Test eine höhere Sensitivität als kompetitive oder bindungsinhibitierende Tests. Für dieses Testformat muss die Probe akkurat dosiert und das Mischen für eine Verdünnung der Probe gegeben sein. [20; 30]

4 Physikalische Grundlagen

4.1 Fluoreszenz

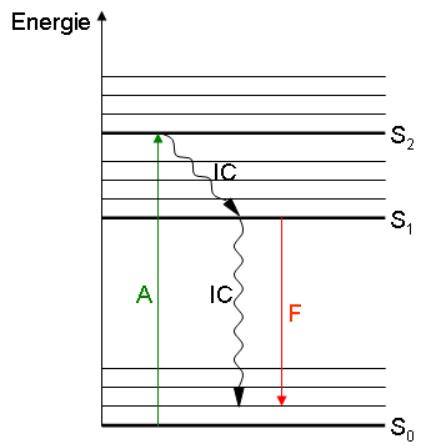


Abb. 9 Jablonski-Diagramm [31]

Anregung von Elektronen auf höhere Energiezustände ($S_{1,2}$) durch Absorption (A) von Photonen. Rückfall der höheren Energieniveaus auf das Grundniveau S_0 durch strahlungslose Umwandlung (IC) oder Fluoreszenz (F).

Lumineszenz ist die Freisetzung von optischer Strahlung durch den Übergang von angeregten Elektronen in den Grundzustand. Wird die Anregung durch Photonen bewirkt, so spricht man von Photolumineszenz. Neben der Phosphoreszenz ist die Fluoreszenz in die Photolumineszenz eingruppiert. Der Hauptunterschied liegt in der Lebensdauer der Lichtemission. Für die Fluoreszenz ist diese bedeutend kürzer und liegt bei ca. 10^{-8} s. Im Jablonski-Diagramm (Abb. 9) ist dargestellt, wie ein Elektron von dem Grundzustand S_0 in den angeregten Zustand S_2 durch Absorption (A) eines Photons übergeht. Da der Zustand nicht stabil ist, fällt das Elektron auf den geringeren Energiezustand S_1 zurück. In diesem Fall wird Energie freigesetzt, die durch strahlungslose Umwandlung (IC) abgegeben wird. Fällt das Elektron auf den Grundzustand zurück, wird die verbliebene Energie in Form von Photonenemission, also Fluoreszenz (F), freigesetzt oder wird wiederum durch IC abgegeben. Unter der Quantenausbeute Φ_{FL}, auch Quanteneffizienz genannt, wird der Bruchteil der Übergänge von S_1 nach S_0 verstanden, bei dem ein Photon emittiert wird. Sie kann aus dem Quotienten der Übergänge von S_1nach S_0 mit Fluoreszenz k_F und deren Summe mit strahlungsfreien Übergängen k_S berechnet werden mit:

Gleichung 4 Quantenausbeute [32]

$\Phi_{FL} = k_F / (k_F + k_S)$	Φ_{FL} = Quantenausbeute [ ] k_F = Übergangsrate von S_1 nach S_0 mit Fluoreszenz k_S = Strahlungsfreie Übergangsrate von S_1 nach S_0

Somit gibt die Quantenausbeute die Wahrscheinlichkeit an, bei der ein emittiertes Photon durch ein absorbiertes Photon entsteht. Der Extinktionskoeffizient einer Substanz ist die Maßangabe zur Fähigkeit, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren. Das Lambert-Beer´sche Gesetzte gibt die Extinktion E als Summe aus Absorption und Streuung von Licht einer bestimmten Wellenlänge an mit:

Gleichung 5 Lambert-Beer´sches Gesetz [32]

$E = -\log\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d$ mit $\varepsilon_\lambda = \alpha_\lambda \cdot \log(e)$	E = Extinktion [ ] I_0 = Lichtintensität des einfallenden Lichts [W/m^2] I_1 = Lichtintensität des transmittierten Lichts [W/m^2] ε_λ = Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}] c = Konzentration [M] α_λ = Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}] d = Zurückgelegter Weg des Lichts [cm]

Strahlt Licht mit einer Intensität I_0 durch eine Substanz in eine Lösung ein, werden Teile des Lichts wellenlängenabhängig absorbiert, reflektiert und mit I_1 transmittiert. Diese Anteile sind vom zurückgelegten Weg des Lichts d in der Substanz, dessen vorliegender Konzentration c und dessen spezifischem Extinktionskoeffizient abhängig. So können durch z. B. die Aufnahme von Absorptionsspektren Subtanzen untersucht werden.

Es gibt eine Reihe von Subtanzen, die besonders gut dazu geeignet sind, zur Fluoreszenz angeregt zu werden. Sie weisen im Allgemeinen einen hohen Extinktionskoeffizienten mit gleichzeitig hoher Quantenausbeute auf. Ein solcher Fluoreszenzfarbstoff, oder auch Fluorchrom, ist z. B. das Alexa Fluor 647 mit einem Absorptionsmaximum bei λ_{Amax} = 650 nm, einem Emissionsmaximum bei λ_{Emax} = 665 nm und einem Extinktionskoeffizienten von α_λ = 239 000 M^{-1}cm^{-1} bei λ_{Amax} [33]. Sind solche Farbstoffe an z. B. ein Protein gekoppelt, können diese durch die Detektion der Fluoreszenz nachgewiesen werden. Wie den Angaben des Extinktionskoeffizienten und des Absorptionsmaximums zu entnehmen ist, weist das emittierte Photon im Vergleich zum absorbierten Photon eine höhere Wellenlänge auf. Diese Verschiebung nennt sich Stokes-Shift. Die Energiedifferenz, die durch den Energieverlust von S_2 nach S_1 entsteht, hängt direkt mit dem Stokes-Shift zusammen und berechnet sich nach:

Gleichung 6 Energie der Photonen-Emission [34]

$$\Delta E = hc\left(\frac{1}{\lambda_{ab}} - \frac{1}{\lambda_{em}}\right)$$

E = Energie Photon [J]
λ_{ab} = Absorbierte Wellenlänge [m]
λ_{em} = Emittierte Wellenlänge [m]
h = Plancksches Wirkungsquantum (6,626 10^{-34} Js)
c = Lichtgeschwindigkeit [299792458 m/s]

Diese Verschiebung hin zu höheren Wellenlängen von λ_{ab} zu λ_{em} ermöglicht es durch spektrale Filter das Anregungslicht von der Fluoreszenz zu trennen, wodurch vielzählige Möglichkeiten für Detektionssysteme entstehen. [17; 31]

4.2 Total Internal Reflection Fluorescence

Für die Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) wird Licht in ein Medium mit höherem Brechungsindex als das umgebende Medium eingekoppelt. Zum Einkoppeln kann z. B. ein optisches Gitter verwendet werden. Ist der Einfallswinkel nach dem Einkoppeln groß genug, wird das Licht an der Grenzfläche des Mediums mit höherer Brechzahl total reflektiert. Durch die Totalreflektion entsteht ein Feldanteil, der aus dem optisch dichteren Medium in das optisch dünnere Medium eindringt: das evaneszente Feld. Wird Licht in eine dünne Schicht eines optisch dichteren Mediums, das von einem optisch dünneren Medium umgeben ist, eingekoppelt, so kann das Licht im optisch dichten Medium geführt werden. Somit fungiert diese Schicht als optischer Wellenleiter, in dem das Licht durch mehrfache Totalreflektion geführt wird. So kann das evaneszente Feld sehr effizient oberflächennah immobilisierte Fluoreszenzmoleküle anregen. In den folgenden Kapiteln sollen die Totalreflektion, das evaneszente Feld und die Beugung am Gitter erklärt werden. Anhand von Beispielen am verwendeten Wellenleiterchip werden dessen Charakteristika berechnet.

4.2.1 Totalreflektion

Durch das Snelliussche Brechungsgesetz ist der Zusammenhang zwischen Ein- und Austrittswinkel und der Brechzahl der Medien gegeben, wie auch der Laufgeschwindigkeit. Für die Erklärung der Totalreflektion ist Letzteres irrelevant.

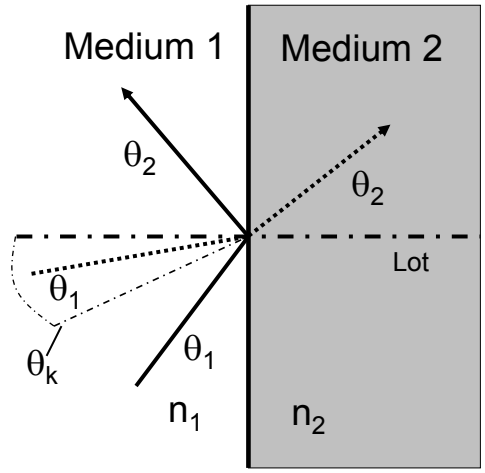
Gleichung 7 Snelliussches Brechungsgesetz [34]

$$\frac{\sin\theta_1}{\sin\theta_2} = \frac{c_1}{c_2} = \frac{n_2}{n_1}$$

$c_{1,2}$ = Lichtgeschwindigkeit im Medium [m/s]
$n_{1,2}$ = Brechzahl Medium [ ]
θ_1 = Einfallswinkel (Medium 1) [°]
θ_2 = Brechungswinkel (Medium 2) [°]

Trifft ein Lichtstrahl von einem optisch dichteren Medium auf ein optisch dünneres Medium, wird dieser je nach Einfallswinkel reflektiert oder transmittiert, wie in Abb. 10 dargestellt. Ist der Eintrittswinkel θ_1 kleiner als der kritische Winkel θ_k, wird der Strahl transmittiert und dringt in das optisch dünnere Medium ein. Ist der Eintrittswinkel θ_1

größer als der kritische Winkel θ_k, wird der Strahl reflektiert und man spricht von Totalreflektion.



θ_1 = Einfallswinkel (Medium 1) [°]
θ_2 = Resultierender Winkel (Medium 1, 2) [°]
θ_k = Kritischer Winkel [°]
$n_{1,2}$ = Brechzahl Medium [ ]

Abb. 10 Brechungseigenschaften von Licht

Unter der Bedingung, dass die Brechzahl des Mediums n_1 größer als n_2 ist, hängt der Reflektions- bzw. Transmissionswinkel θ_2 eines einfallenden Lichtstrahls vom Einfallswinkel θ_1 ab. Ist der Winkel θ_1 größer als der kritische Einfallswinkel θ_k, wird das Licht reflektiert, ist θ_1 kleiner, wird es transmittiert.

Der kritische Winkel θ_k ist demnach ausschlaggebend für den resultierenden Winkel, alle Winkel größer θ_k resultieren in die Totalreflektion. Aus dem Snelliusschen Brechungsgesetz abgeleitet, kann der kritische Winkel θ_k folgenderweise berechnet werden:

Gleichung 8 Kritischer Winkel [34]

$$\sin\theta_k = \frac{n_2}{n_1}$$

θ_k = Kritischer Winkel [°]
$n_{1,2}$ = Brechzahl Medium [ ]

Der kritische Winkel θ_k von der Grenzfläche Ta_2O_5 (n_{Tantal}=2,126) zu Luft (n_{Luft}=1) liegt bei 28,1 °, zu Wasser (n_{Wasser}=1,33) bei 38,7 ° und für Glas ($n_{Substrat}$=1,518) bei 45,6 °. [34; 35]

4.2.2 Evaneszentfeld

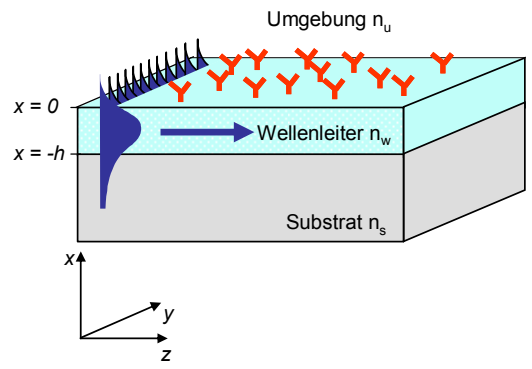


Abb. 11 Propagierende Welle [36]

Darstellung der Ausbreitung einer evaneszenten Welle und die Anregung von Molekülen (Y-Form). Die blau dargestellte Fläche des Wellenleiters entspricht der Ta_2O_5 Schicht.

Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, werden Lichtstrahlen mit dem Einfallswinkel $\theta_1 > \theta_k$ total reflektiert. Dennoch entsteht ein elektromagnetisches Feld, welches in das angrenzende Medium mit dem kleineren Brechungsindex eindringt. Dieses sogenannte Evaneszentfeld hat jedoch nur eine geringe Eindringtiefe von ca. 100 nm. In Abb. 11 ist die Ausbreitung einer solchen evaneszenten Welle gezeigt. Es ist ein Feld zu sehen, welches in die Umgebung eindringt und die immobilisierten Moleküle (in Y-Form) oberflächennah anregt. Sind diese mit einem Fluorochrom markiert, können sie durch dieses Feld zur Fluoreszenz angeregt werden. Für den verwendeten Wellenleiterchip (siehe Kapitel 4.2.3) ist das Schema in Abb. 11 identisch zutreffend. Es befinden sich zwei umgebende und niederbrechende Medien um den hochbrechenden Wellenleiter. Das Medium der Umgebung mit n_u entspricht der Probe, das Substrat dem Glas mit n_s und der Wellenleiter dem aufgesputterten Ta_2O_5 mit n_w. Die Raumrichtungen des Chips sind mit den Achsen x, y und z gekennzeichnet. Durch die Maxwell-Gleichungen ergibt sich, dass das elektrische Feld in y-Richtung E_y entlang der Grenzschicht des Wellenleiters zwischen $x = 0$ und $x = -h$ stetig ist. Für transversal-elektrisch (TE) polarisiertes Licht berechnet sich die Feldverteilung mit:

Gleichung 9 Feldverteilung für TE-Moden [36]

$$E_y = E_{y,\max} \cdot \cos\left(\frac{\varphi_u}{2}\right) \cdot e^{-k\sqrt{n_{eff}^2 - n_u^2} \cdot x}$$ Umgebung

$$E_y = E_{y,\max} \cdot \cos\left(k\sqrt{n_w^2 - n_{eff}^2} \cdot x - \frac{\varphi_u}{2}\right)$$ Wellenleiter

$$E_y = E_{y,\max} \cdot \cos\left(k\sqrt{n_w^2 - n_{eff}^2} \cdot h + \frac{\varphi_u}{2}\right) \cdot e^{k\sqrt{n_{eff}^2 - n_s^2} \cdot (x+h)}$$ Substrat

mit $k = \frac{2\pi}{\lambda}$, $n_{eff} = n_w \sin\theta_1$ und $\varphi_u = -2\arctan\left(\frac{\sqrt{n_{eff}^2 - n_u^2}}{\sqrt{n_w^2 - n_{eff}^2}}\right)$

E_y = Feldverteilung in y-Richtung
$E_{y,max}$ = Maximale Feldverteilung in y-Richtung
n_u, n_w, n_s = Brechungsindizes von Umgebung (u), Wellenleiter (w) und Substrat (s) [ ]
n_{eff} = Effektiver Brechungsindex [ ]
x = Strecke in x-Richtung[m]
y = Strecke in y-Richtung [m]
h = Dicke des Wellenleiters [m]
k = Kreiswellenzahl [m^{-1}]
λ = Wellenlänge [m]
φ_u = Phasensprung bei Totalreflexion an der Deckschicht [ ]
θ_1 = Einfallswinkel [°]

Aus den Gleichungen geht hervor, dass die Verteilung des elektrischen Feldes für die die Umgebung und das Substrat mit zunehmenden Abstand x exponentiell abnimmt. Die Anzahl der Moden innerhalb des Wellenleiters ist abhängig von der Dicke der Wellenleiterschicht h, der Wellenlänge λ, dem Brechungsindex des Wellenleiters n_w und des Substrats n_s sowie den Phasensprüngen an den Grenzflächen der Umgebung φ_u. Die Phasensprünge treten auf Grund der Laufzeitunterschiede im Wellenleiter auf. Mit der Charakteristischen Gleichung für Wellenleiter können so die Anzahl der Moden bestimmt werden:

Gleichung 10 Charakteristische Gleichung für Wellenleiter [36]

$$2 \cdot h \cdot \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \sqrt{n_w^2 - n_{eff}^2} + \varphi_u + \varphi_s = 2 \cdot \pi \cdot m$$

mit

$$n_{eff} = n_w \sin\theta_1$$

und

$$\varphi_{u,s} = -2 \cdot \arctan\left(\frac{\sqrt{n_{eff}^2 - n_{u,s}^2}}{\sqrt{n_w^2 - n_{eff}^2}}\right)$$

h = Dicke des Wellenleiters
λ = Wellenlänge des geführten Lichts
φ_u = Phasensprung an der Grenzfläche zur Umgebung
φ_s = Phasensprung an der Grenzfläche zum Substrat
n_{eff} = Effektiver Brechungsindex
n_w = Brechungsindex Wellenleiter
n_s = Brechungsindex Substrat
n_u = Brechungsindex Umgebung
θ_1 = Einfallswinkel [°]

Die Schichtdicke des verwendeten Ta_2O_5-Wellenleiters beträgt h = 155nm. Somit beträgt die Anzahl der Moden m = 0; mit Tantalpentoxid n_w = 2,126, Substrat n_s = 1,518, n_u = 1,33 und der Wellenlänge λ = 638,2 nm. Aus diesem Grund handelt es sich hierbei um einen monomoden Wellenleiter, d. h. nur eine Mode wird im Wellenleiter geführt, wie in Abb. 11 dargestellt. Diese Tatsache limitiert den Winkel unter dem Licht im Wellenleiter geführt wird. Da sich aus der Charakteristischen Gleichung auch der Einfallswinkel θ_1 durch den effektiven Brechungsindex n_{eff} berechnen lässt, ergibt sich für m = 0 mit den Nennwerten ein Einfallswinkel von θ_1 = 59,73 °. Dieser theoretisch bestimmte Winkel stimmt sehr gut mit dem Winkel überein, der im Folgenden aus der Beugung am Gitter in Kapitel 4.2.3 bestimmt wurde, mit θ_1 = 59,9 °.

Der Anteil der evaneszenten Welle, der die Fluoreszenz-Farbstoffe anregt, ist der Anteil x_u in Gleichung 11. Die Eindringtiefe in diese Umgebung berechnet sich nach:

Gleichung 11 Eindringtiefe [37]

$$x_u = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_w^2 \sin^2\theta_1 - n_u^2}}$$

x_u = Eindringtiefe der evaneszenten Welle in die Umgebung
λ = Wellenlänge des geführten Lichts
n_w = Brechungsindex Wellenleiter
n_u = Brechungsindex Umgebung
θ_1 = Einfallswinkel [°]

Für das Beispiel Tantalpentoxid (n_w = 2,126) gegen Wasser (n_u=1,33) unter dem Eintrittswinkel θ_1 = 59,9° entsteht so eine Eindringtiefe von x_u = 79,9 nm. An dieser Stelle beträgt laut Gleichung die Intensität des evaneszenten Feldes noch 37 % (1/e) der maximalen Intensität I_0 auf Grund der exponentiellen Dämpfung des Feldes. Die Feldstärke an der Grenzfläche berechnet sich mit:

Gleichung 12 Feldstärke an der Grenzfläche Wellenleiter-Umgebung [37]

$E_y(0) = E_{y,\max} \cdot \cos\left(\frac{\varphi_u}{2}\right)$	E_y = Feldverteilung in y-Richtung $E_{y,max}$ = Maximale Feldverteilung in y-Richtung φ_u = Phasensprung bei Totalreflexion an der Umgebung

Aus diesem Zusammenhang kann die Intensität an der Grenzfläche der Umgebung bestimmt werden mit:

Gleichung 13 Intensität an der Grenzfläche Wellenleiter-Umgebung [37]

$I(0) = E_{y,\max}^2 \cdot \cos^2\left(\frac{\varphi_u}{2}\right)$	I(0) = Intensität an der Grenzfläche Wellenleiter Deckschicht $E_{y,max}$ = Maximale Feldverteilung in y-Richtung φ_u = Phasensprung bei Totalreflexion an der Umgebung

Zusammengefasst kann also durch die Führung von Licht in einem Wellenleiter ein evaneszentes Feld erzeugt werden, das sehr gut dazu geeignet ist, an die Oberfläche angebundene Fluorochrome (siehe Kapitel 4.1) effektiv anzuregen [38-41]. Diese Technik wird als TIRF bezeichnet. Eine besonders hohe Effizienz bei der Anregung kann durch die evaneszente Welle durch ein hochbrechendes Medium wie Ta_2O_5 erzeugt werden, wie auch schon in [42-44] beschrieben ist.

4.2.3 Wellenleiterchip mit optischem Gitter

Der in Abb. 12 a) gezeigte Wellenleiterchip ist speziell zur Verwendung der TIRF-Technologie ausgelegt, welche in den vorangehenden Kapiteln erklärt ist. Hierbei ist der Querschnitt mit den Abmessungen dargestellt. Die Länge beträgt 10 mm und das Licht wird im Wellenleiter über die Länge von 6,5 mm geführt. Die Breite beträgt 20 mm über die sich das Gitter erstreckt. Licht wird hierbei mit einer Laserlinie mit 10 mm Breite mittig über das Gitter eingekoppelt. So wird der Auslesebereich von 5,5 mm auf 7 mm, auf dem sich das Mikroarray befindet, komplett ausgeleuchtet. In Abb. 12 b) ist der Querschnitt des Wellenleiterchips zu sehen. Die Laserlinie trifft unter dem Winkel von 9 ° nach Durchtritt des Substrats auf das optische Gitter.

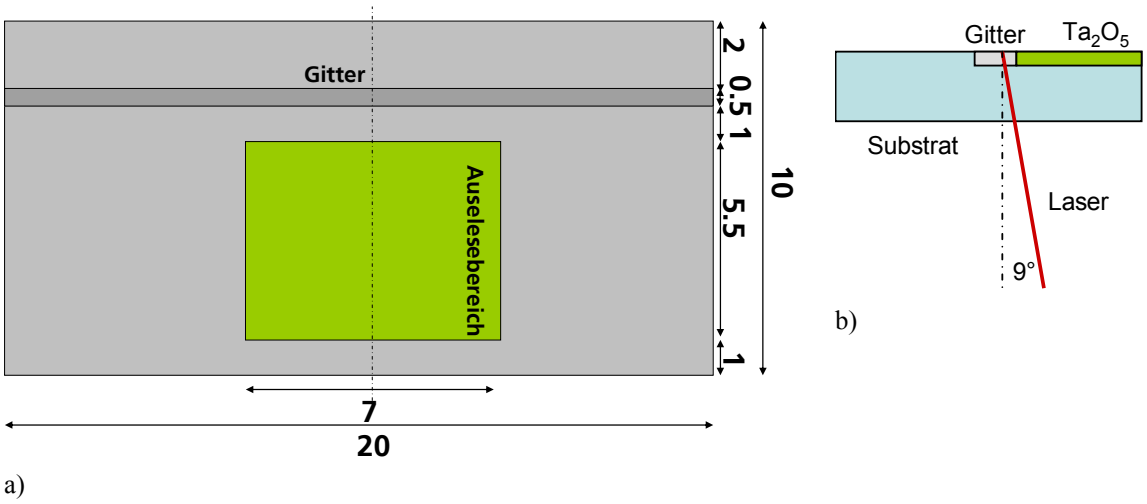


Abb. 12 Aufbau des Wellenleiterchips

a) Aufsicht des Wellenleiterchips. Der Auslesebereich des Mikroarrays findet im grün markierten Areal statt. Das optische Gitter erstreckt sich über die gesamte Länge des Chips, in Dunkelgrau gekennzeichnet.

b) Seitenansicht des Wellenleiterchips. Einkopplung in die Wellenleiterschicht aus Ta_2O_5 (grün) über das optische Gitter (grau) unter 9 °. Das Ta_2O_5 ist auf dem Substrat (blau) aufgesputtert, diese Chipseite wird als Vorderseite definiert, gegenüber befindet sich die Rückseite.

Die Wellenleiterschicht ist eine 155 nm dünne Ta_2O_5 Schicht, die auf einem Glasträger als Substrat (n_S = 1,518) aufgesputtert ist. Die Wellenleiterschicht wird als Vorderseite definiert, gegenüber befindet sich am Glassubstrat die Rückseite. Ein Laserstrahl kann durch das integrierte optische Gitter in diese Wellenleiterschicht eingekoppelt werden. Die Berechnung der Beugung am Gitter ist wie folgt:

Gleichung 14 Beugungsgitter [35]

$$n \cdot \sin\theta_{max} = k\frac{\lambda}{g} + \sin\theta_1$$

θ_{max} = Beugungswinkel in Richtung Maxima [°]
θ_1 = Eintrittswinkel [°]
g = Gitterkonstante (Periode) [m]
λ = Wellenlänge [m]
k = Beugungsordnung (± 1, 2, 3…)
n = Brechzahl Medium hinter dem Gitter [ ]

Das Gitter des Chips hat eine Periode von g = 318 nm. Da der Laserstrahl mit λ = 638,2 nm unter θ_1 = 9,6 °auf das Gitter trifft, beträgt der Beugungswinkel θ_{max} = 59,9 °. Unter diesem Winkel trifft der Strahl auf die Ta_2O_5 Wellenleiterschicht.

4.3 Abstrahlcharakteristik oberflächennaher Fluorochrome

Die Abstrahlung von Fluoreszenz im Raum ist nicht homogen, sie besitzt eine charakteristische Winkelabhängigkeit, wenn sich die Fluorochrome nah an einer Oberfläche befinden [45]. Bei Biochips ist diese Abstrahlcharakteristik gegeben und diese sollte vor allem auf der Detektionsseite berücksichtigt werden. Aus diesem Grund werden an die-

ser Stelle die Eigenschaften der Fluoreszenz nahe einer Grenzflächen zweier Medien erklärt. Unter der Voraussetzung, dass die zwei Medien einen unterschiedlichen Brechungsindex aufweisen, strahlt die Fluoreszenz den Hauptanteil der Intensität in das Medium mit höherem Brechungsindex ab, wie in Abb. 13 am Beispiel eines Glassubstrats dargestellt ist [46]. In Bezug auf einen Biochip stellt die Seite in Richtung der Emission der Hauptanteile die Rückseite dar.

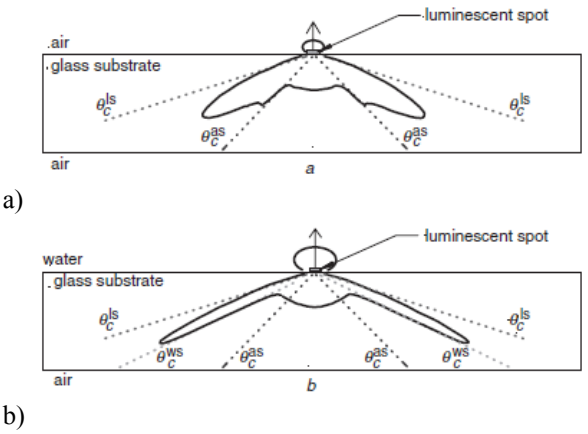


Abb. 13 Abstrahlcharakteristik oberflächennaher Fluoreszenz [46]

a) Abstrahlcharakteristik Luft (air) gegen ein Glassubstrat (glass)

b) Abstrahlcharakteristik Wasser (water) gegen ein Glassubstrat (glass)

In [46; 47] ist beschrieben, wie der Brechungsindex eines angrenzenden Mediums von Luft (air) bzw. Wasser (water) an ein Glassubstrat (glass) die Abstrahlcharakteristik eines fluoreszierenden Spots (luminescent spot) von der Dicke eines Zehntels einer Wellenlänge λ beeinflusst. Während die Abstrahlcharakteristik zum Wasser und zur Luft weitestgehend homogen aber von geringer Intensität ist, weist die Abstrahlung in das Glassubstrat ein stark winkelabhängiges Profil auf. Die kritischen Winkel θ_c^{as} Luft zu Glas, θ_c^{ws} Wasser zu Glas und θ_c^{ls} Spot zu Glass sind der Abbildung zu entnehmen. Sitzt der Detektor im Bereich der unteren Luftschicht wird deutlich, dass ein Großteil der emittierten Fluoreszenz durch Totalreflektion für Winkel $> \pm\theta_c^{as}$ im Glassubstrat verbleibt und somit nicht detektiert werden kann. Die Intensitätsmaxima liegen im Fall a) bei ca. 41 ° und im Fall b) bei ca. 70 °. Für Winkel $< \pm\theta_c^{as}$ wird die Detektion noch zusätzlich dadurch erschwert, dass ausgekoppeltes Licht nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz (siehe Gleichung 7, Seite 18) vom Lot weggebrochen wird, also von der Richtung zum Detektor abgelenkt wird. Diese Gegebenheit ist in einem Schema mit dem Wellenleiterchip in Abb. 14 dargestellt. In [46] wird diese Gegebenheit durch eine spezielle Anordnung von diffraktiven Elemente umgangen und so wird eine 25-fache Steigerung und mehr erreicht.

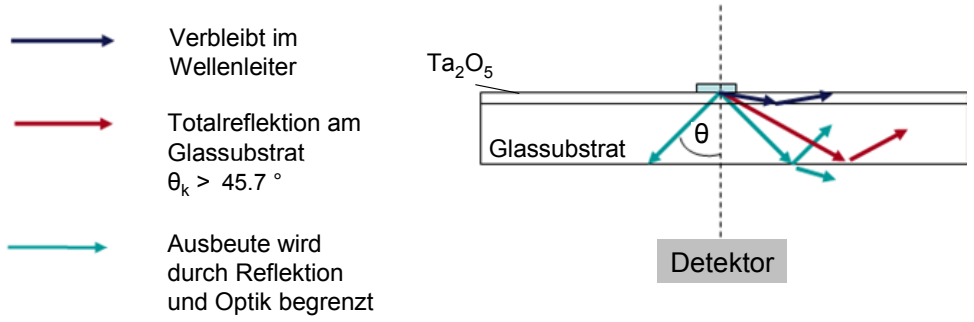


Abb. 14 Fluoreszente Abstrahlung zum Detektor [36]

Ein Großteil der emittierten Strahlung verbleibt in der Wellenleiterschicht Ta_2O_5 oder im Glassubstrat. Die ausgekoppelten Lichtanteile an der Chiprückseite werden vom Lot weggebrochen und erschweren die Erfassung mit dem Detektor.

4.4 Dämpfung

Durch die in Kapitel 4.2.1 beschriebene Wellenleitung wird das Licht in der Ausbreitungsrichtung gedämpft und verliert an Strahlungsleistung P. Der beschriebene Wellenleiterchip hat im Durchschnitt eine Dämpfung von 1 dB/cm und verliert somit 21 % an Strahlungsleistung nach l = 1 cm Wellenleitung. [48]

Gleichung 15 Dämpfung [48]

$$d = \frac{1}{l} 10 \cdot \log\left(\frac{P_o}{P_z}\right)$$

d = Dämpfung [dB]
P_0 = Strahlungsleistung [W]
P_z = Ausgangsleistung [W]
l = Strecke [cm]

4.5 Theoretische Berechnung der Anregung durch TIRF

In diesem Kapitel soll die emittierte Leistung von Fluorochromen eines Spots auf dem planaren Wellenleiterchip theoretisch abgeschätzt werden. Als Grundlage der Abschätzung dient der aminoreaktive Farbstoff Alexa 647 [33], welcher auf einem Biochip mit einer Aminosilanoberfläche reagiert. Hierzu wird in den folgenden Schritten die emittierte Leistung der Fluoreszenz hergeleitet und bis hin zu einem Grauwert verrechnet, der von einem Pixel der Kamera als Detektor erfasst wird:

- Als Ausgangsbedingung wird angenommen, dass die Linienoptik des Diodenlasers eine Leistung von $P_L = 0{,}7$ mW ausweist. Die Linie leuchtet das optische Gitter des Wellenleiterchips komplett aus.
- Durch das Einkoppeln in das optische Gitter wird nur die -1. Ordnung in den Wellenleiter gekoppelt, zur Berechnung dieses Verlusts gilt:

Gleichung 16 Verteilung der Flussdichte [49]

$$I(\theta_2) = I_0 \left(\frac{\sin \beta}{\beta} \right)^2 \cdot \left(\frac{\sin N\alpha}{\sin \alpha} \right)^2$$

mit

$$\alpha = \frac{\pi \cdot n_w \cdot g \cdot \sin \theta_1}{\lambda}$$

und

$$\beta = \frac{\pi \cdot n_w \cdot g \cdot \sin \theta_1}{2 \cdot \lambda}$$

$I(\theta_2)$ = Intensität in Richtung des resultierenden Winkels
θ_2 = Resultierender Winkel[°]
I_0 = Intensität bei $\theta_1 = 0$ °
θ_1 = Eintrittswinkel [°]
N = Anzahl der Spalten [ ]
g = Gitterkonstante (Periode) [m]
λ = Wellenlänge [m]
n_w = Brechzahl Medium hinter dem Gitter [Ta_2O_5: 2,126]

Durch Einsetzen des Winkelbereichs -90 ° < θ_1 < 90 ° erhält man die Verteilung der Flussdichte des resultierenden Winkels $I(\theta_2)$. In Abb. 15 ist $I(\theta_2)$ für N = 100 dargestellt. Die tatsächliche Anzahl der Spalten des Gitters des Wellenleiterchips beträgt N = 1572. Für diese Spaltanzahl sind die Maxima jedoch so dünn, dass sie graphisch nicht mehr darzustellen sind.

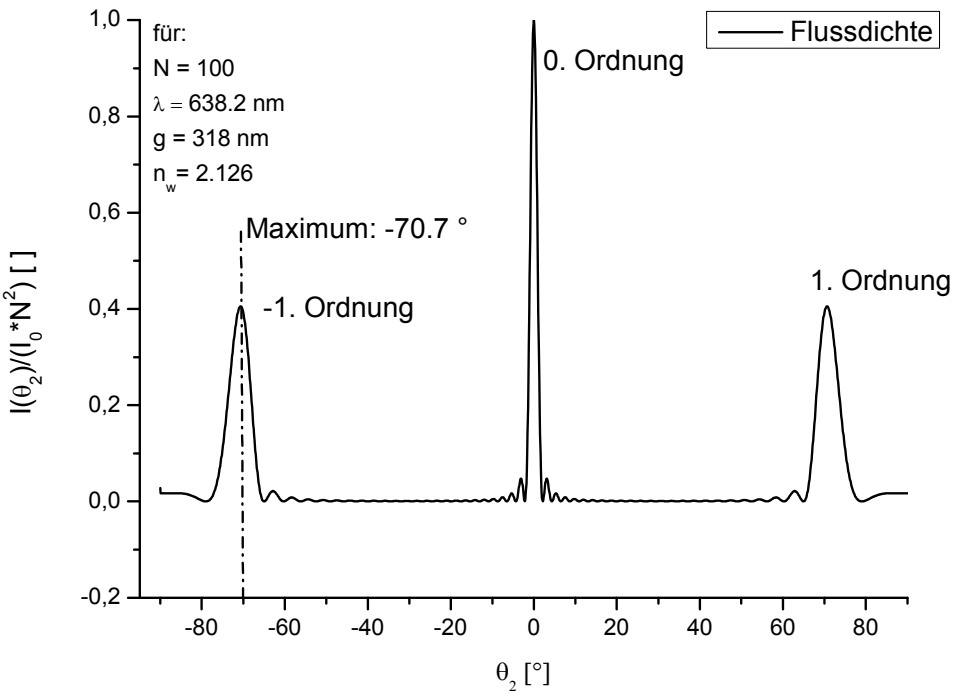


Abb. 15 Verteilung der Flussdichte

Verteilung der Flussdichte nach Gleichung 16 für N = 100 Spalten mit den Kenndaten des optischen Gitters des Wellenleiterchips. Die ± 1. Ordnung haben ihr Maximum bei ca. ± 70,7 °.

In Abb. 15 ist zu sehen, dass sich das Maximum der -1. Ordnung bei ca. θ_2 = -70,7 ° befindet. Durch Integration der Gleichung 16 mit $\int_u^o f(\theta_2)\, d\theta_2$ unterer Grenze u_1 = -90 ° und oberer Grenze o_1 = 90 ° und zusätzlich mit unterer Grenze u_2 = - 71,7 und oberer Grenze o_2 = - 69,7 ° ergibt sich ein prozentualer Unterschied von 22 % für N = 1572.

- Wie oben gezeigt werden 22 % der gesamten Leistung P_L durch die -1 Ordnung in den Wellenleiterchip gekoppelt. Hierdurch ergibt sich eine eingekoppelte Leistung im Chip von $P_C = P_L*0{,}22 = 0{,}15$ mW.
- Die gesamte Leistung P_i unterhalb der Fläche eines Pixel der Kamera, auf dem sich ein fluoreszierender Spot befindet, ergibt $P_p = 156$ nW mit:

Gleichung 17 Leistung an einem Pixelelement

$$P_p = P_c \frac{b_p}{v \cdot b_L}$$

P_p = Leistung am Pixel [W]
v = Vergrößerungsfaktor Objektiv [0,8]
b_p = Pixelbreite [8,4 µm]
b_L = Strahlbreite Laser [10 mm]

- Das Pixel befindet sich mit l = 5 mm vom Einkoppelgitter entfernt. Dadurch ergibt sich ein Verlust durch Dämpfung nach Gleichung 15 (siehe S. 26) von 11 % auf $P_D = P_p*0{,}89 = 139$ nW.
- Da das evaneszente Feld eine Intensitätsverteilung besitzt, muss die effektive Leistung am Pixel berechnet werden. Diese Verteilung ist in Abb. 16 dargestellt. Als Annahme zur Berechnung wird abgeschätzt, dass sich die immobilisierten Fluorochrome im Spot innerhalb von 0 nm < x < 10 nm (weitere Erklärung s. u.) befinden, wenn sie reagiert haben und so an die Oberfläche gebunden sind. Durch Integration der Gleichung 9 (siehe S. 21) mit $\int_u^o (f(x))^2 \, dx$, dessen Verteilung in Abb. 16 zu sehen ist, ergibt sich mit unterer Grenze $u_1 = -\infty$ nm und oberer Grenze $o_1 = \infty$ nm und unterer Grenze $u_2 = 0$ nm und oberer Grenze $o_2 = 10$ nm das Verhältnis der Gesamtleistung von P_p und der Leistung innerhalb von 10 nm der Umgebung P_{10} von $P_{10D}/ P_D = 2{,}2$ %. Somit beträgt $P_{10D} = 3$ nW. Hierbei wird die Abstrahlung zur Vorderseite des Chips vernachlässigt.

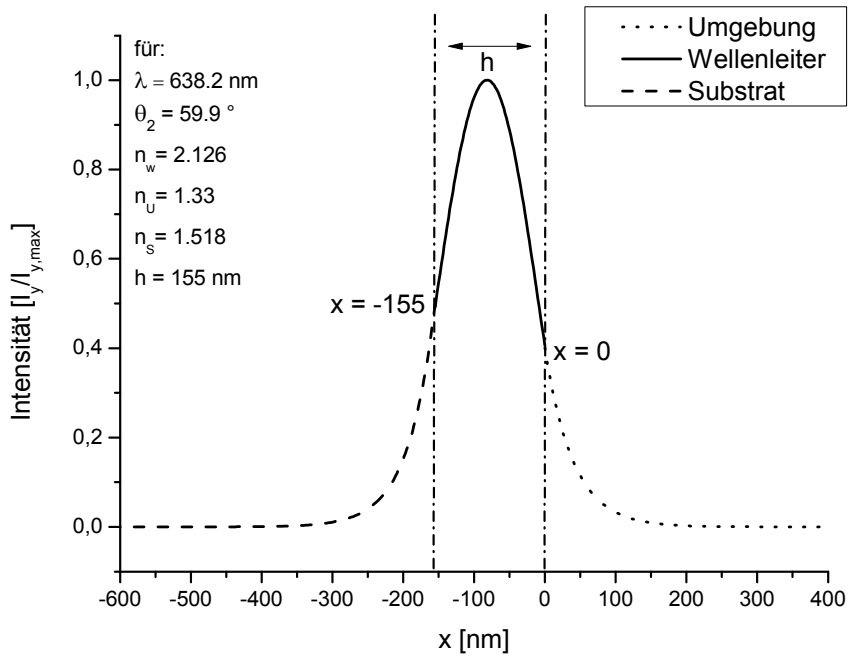


Abb. 16 Verteilung der Intensität im Wellenleiter

Verteilung der normierten Intensität im Wellenleiter nach Gleichung 9 „Feldverteilung für TE-Moden " (S. 21). Kenndaten sind dem Graphen zu entnehmen.

- Für die weitere Berechnung wird angenommen, dass ein Mikrospot das Volumen einer Kugelschalotte besitzt. Die mit Fluoreszenz markierten Moleküle befinden sich in Dimethylsulfoxid, was laut [50] auf mit Aminosilan modifizierten Glasoberflächen zu einen Kontaktwinkel von $\Theta = 28{,}9\ °$ führt.
- Das Volumen eines Spots überhalb der Fläche eines Pixels mit dem Radius der Kugelschalotte r_T als Spotradius mit 135 µm und einem Kontaktwinkel des Spots $\Theta = 28{,}9\ °$ beträgt $V_p = 2{,}8 \times 10^{-15}\ m^3$ bzw. 2,8 pl.

Gleichung 18 Volumen überhalb des Pixels [51]

$$V_p = b_p \cdot l_p \cdot h$$

mit näherungsweise

$$h = \tan\left(\frac{\Theta}{2}\right) \cdot r_T$$

V_p = Volumen überhalb des Pixels [m^3]
b_p = Pixelbreite [8,4 µm]
l_p = Pixellänge Laser [9,8 µm]
r_T = Radius des Schnittkreises [135 µm]
Θ = Kontaktwinkel [28,9 °]

- In V_P befindet sich mit $c = 10^{-8}$ M die Stoffmenge $n = c*V_p = 2{,}8 \times 10^{-20}$ mol von Fluorochromen. Diese Stoffmenge reagiert mit der funktionellen Oberfläche des Biochips, die Fluorochrome binden kovalent an die Oberfläche. Somit wird abgeschätzt, dass nun alle Moleküle innerhalb von ca. x = 10 nm von der Oberfläche entfernt liegen. In dem Volumenareal von $V_{reag} = l_p*b_p*x$ befindet sich nach der Reaktion des Mikrospots die Konzentration $c_{reag} = n / V_{reag} = 3{,}3 \times 10^{-5}$ M.

- Laut Angabe des Herstellers sind die Farbstoffe zu mindestens 50 % reaktiv [33]. Zusätzlich wird abgeschätzt, dass ca. 15 % der Farbstoffe durch das Blocken abgewaschen werden. Somit wird angenommen, die reaktiven Farbstoffe binden zu 35 % und somit ergibt sich $c_{bind} = c_{reag}*0{,}35 = 1{,}1x10^{-5}$ M.
- Der Spot besteht aus einer Lösung mit Alexa 647 Farbstoff in einer Konzentration von $c_{bind} = 1{,}1x10^{-5}$ M mit dem Extinktionskoeffizienten $\alpha_{eff} = 239\,000\ M^{-1}cm^{-1}$ [33] und der Länge eines Pixels l_p als Absorptionslänge $d = l_p = 9{,}4\ \mu m$. Daraus ergibt sich nach Gleichung 19 eine absorbierte Leistung von $P_{abs} = 7{,}4$ pW mit:

Gleichung 19 Absorbierte Leistung [36]

$$P_{abs} = P_{10D} \cdot \left(1 - e^{-\alpha_{eff} \cdot c_{bind} \cdot d / v}\right)$$

P_{abs} = Absorbierte Leistung [W]
P_{10D} = Leistung an einem Pixel [W]
c_{bind} = Konzentration [M]
α_{eff} = Extinktionskoeffizient [M^{-1} cm^{-1}]
v = Vergrößerungsfaktor Objektiv [0,8]
d = Zurückgelegter Weg des Lichts [cm]

- Die emittierte Leistung P_{em} ergibt sich aus dem Produkt der absorbierten Leistung P_{abs} mit der Quantenausbeute (siehe Gleichung 4, S. 17) $\Phi_{FL} = 0{,}33$. Zusätzlich wird $\lambda_{em} / \lambda_{ab}$ berücksichtigt, dass nach Gleichung 6 (S. 18) den Energieverlust durch die Verschiebung der Wellenlänge beinhaltet zu $P_{em} = \Phi_{FL}*P_{abs}*\lambda_{em} / \lambda_{ab} = 2{,}4$ pW.
- Auf Grund der anisotropen Abstrahlcharakteristik oberflächennaher Fluorochrome (siehe Kapitel 4.3, S. 24) wird angenommen, dass nur ca. 6 % der emittierten Leistung P_{em} in Richtung Detektor P_{Det} abstrahlt, also $P_{Det} = P_{em}*0{,}06 = 144$ fW.
- Durch den Öffnungswinkel des Objektivs vor der Kamera mit N.A. = 0,48 ergibt sich nach Gleichung 20 ein Öffnungswinkel $\alpha = 28{,}7\ °$ in $n_{Luft} = 1$ als Medium.

Gleichung 20 Öffnungswinkel

$$\alpha = \arcsin\left(\frac{N.A.}{n}\right)$$

α = Öffnungswinkel [°]
N.A. = Numerische Apertur [ ]
n = Brechungsindex [ ]

- Unter der Annahme, dass in diesem Bereich die Abstrahlung isotrop ist, wird die effektiv detektierte Leistung P_{eff} errechnet. Hierbei wird das Verhältnis des Öffnungswinkels $\alpha = 28{,}7\ °$ zum maximalen Abstrahlwinkel $\alpha_{max} = 90\ °$ gebildet. Somit können effektiv 31,8 % von der CCD-Kamera erfasst werden mit $P_{eff} = 0{,}318 * P_{Det} = 45{,}8$ fW.
- Nach Gleichung 6 (S. 18) ergibt sich für $\lambda_{em} = 665$ nm eine Energie von $E_{em} = 3x10^{-19}$ J. Daraus ergibt sich ein absolut einfallender Photonenfluss von $\Phi_0 = P_{eff}/E_{em} = 1{,}53x10^5\ s^{-1}$.

- Nach Angaben einer Näherungsformel des Kameraherstellers (Fa. Baumer, Radeberg) ergibt sich daraus nach Gleichung 21 mit der Integrationszeit der Kamera $INT_{Zeit} = 0{,}05$ s und der Quantenausbeute q = 0,9 bei λ_{em} = 665 nm ein Grauwert des Pixels mit $p_i = 129$.

Gleichung 21 Geometriefaktor für die effektive Leistung

$$p_i = \frac{\Phi_0 \cdot q \cdot 0.3 \cdot INT_{Zeit}}{16}$$

p_i = Grauwert Pixel [ ]
Φ_0 = Photonenfluss [s^{-1}]
INT_{Zeit} = Effektive Integrationszeit [s]
q = Quantenausbeute Kamera [0,9]
0,3 = Umrechnung Elektronen in bit Format
16 = Umrechnung 16 bit auf 8 bit Format

Selbstverständlich beinhaltet diese theoretische Berechnung eine Reihe von Abschätzungen, die mit gewissen Fehlern behaftet sind. An mehreren Stellen der Herleitung werden optische Verluste durch Reflektion bzw. Transmission an optischen Komponenten nicht berücksichtigt, wie z. B. am Interferenzfilter oder am Tandemobjektiv. Auch der Einfluss der funktionellen Schicht des Biochips auf das evaneszente Feld wurde vernachlässigt. Dennoch liegt die berechnete Angabe des Grauwerts p_i in der Größenordnung der gemessenen Intensitäten, wie in Abb. 32 (S. 70, Kapitel 12.2) zu sehen ist.

Zusammengefasst bestehen die großen Verluste der TIRF Technik beim Einkoppeln in die Wellenleiter Schicht mit $V_G = 22$ % und hauptsächlich durch die evaneszente Anregung mit $V_E = 2{,}2$ %. Dies ergibt eine nutzbare Leistung von $V_G * V_E = 0{,}5$ % von der Anregungsleistung, was einem Faktor von ca. 200 entspricht. Die Gewinne von TIRF liegen in der vergrößerten Absorptionslänge mit $d_{TIRF} / d_{Auflicht}$ = 11,75 µm / 10 nm, diese absorbiert im Vergleich zu einer Auflichtanregung das ca. 940-fache an Leistung. Weitere Vorteile gegenüber einer Auflichtanregung liegen darin, dass:

- die Bestrahlungsstärke stark erhöht wird, da die Strahllänge des Lasers $l_L = 0{,}5$ mm in die sehr kleine Schichtdicke des Wellenleiters mit h = 155 nm überführt wird.
- die Strahlaufweitung der Anregungsquelle hauptsächlich in nur eine Dimension erfolgt.
- auf der Detektionsseite die Anteile von Störstreulicht der Anregungsquelle stark reduziert sind.
- das Design eines Chips in Verbindung mit einer Flusszelle sehr begünstigt ist.

4.6 Fluidik

4.6.1 Diffusion

Moleküle und Ionen sind der zufälligen thermischen Bewegung unterzogen. Wenn die Temperatur T > 0 K ist, besitzt jedes Teilchen/Molekül eine bestimmte temperaturab-

hängige kinetische Energie. Diese von Brown entdeckte Bewegung ist abhängig von der thermischen Geschwindigkeit und wird als „Brownsche Bewegung“ bezeichnet. Die kinetische Energie E_{kin} hängt mit der thermischen Geschwindigkeit v_T zusammen. Die Brownsche Bewegung wird neben der Temperatur auch von der Teilchenmasse m, wie auch vom umgebenden Medium (Feststoffe, Flüssigkeiten und Gase) beeinflusst.

Gleichung 22 Kinetische Energie [34]

$$E_{kin} = \frac{3}{2} k_B T = \frac{1}{2} m v_T^{\,2}$$

mit

$$\overline{v_T^{\,2}} = 3RT$$

E_{kin} = Kinetische Energie [J]
k_B = Boltzmannkonstante (1,3806504 10^{-23} J/K)
v_t = Thermische Energie [m/s]
T = Temperatur [K]
m = Masse [kg]
R = Gaskonstante [8,3144 J/mol K]

Aus der Formel für die Berechnung der kinetischen Energie geht hervor, dass mit steigender Temperatur T die mittlere thermische Geschwindigkeit v_T zunimmt. Da die Brownsche Bewegung eine statistische Bewegung ist, findet kein gerichteter Teilchentransport statt. Ein gerichteter Transport kann nur stattfinden, wenn ein Konzentrationsgradient des Stoffes in einem Medium vorhanden ist. Die Diffusion gleicht so Konzentrationsdifferenzen aus und diese Gegebenheit wird in Organismen häufig zum Transport von Stoffen über kleine Strecken hinweg verwendet. Die Diffusionsrate J_{diff} nach dem 1. Fick´schen Gesetz gibt an, wie viel Stoffmenge pro Zeiteinheit transportiert wird. Dabei gibt die Diffusionskonstante D nach der Stokes-Einstein-Gleichung die Transportgeschwindigkeit vor. Diese hängt proportional von der absoluten Temperatur T ab und ist umgekehrt proportional zur Viskosität η des Mediums wie auch zur Größe bzw. dem Radius des Teilchens r.

Gleichung 23 Stokes-Einstein-Gleichung und 1. Fick´sches Gesetz [32]

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot r \cdot \eta}$$

und

$$J_{diff} = -D\, grad(c)$$

D = Diffusionskonstante [m^2 /s]
k_B = Boltzmannkonstante (1,3806504 10^{-23} J/K)
T = Temperatur [K]
r = Teilchenradius [m]
η = Viskosität [kg/ m s]
J_{diff} = Diffusionsstrom [mol/ m^2 s]
grad (c)= Gradient im Raum mit

$$grad(c) = \begin{pmatrix} \partial c / \partial x \\ \partial c / \partial y \\ \partial c / \partial z \end{pmatrix}$$

Das 1. Fick´sche Gesetz beschreibt ausschließlich stationäre Diffusionsvorgänge, bei denen sich die Konzentration im Laufe der Zeit nicht ändert. Der Gradient grad(c) gibt den Konzentrationsgradienten in drei Raumrichtungen an. Da der Gradient mit zunehmender Diffusionsstrecke exponentiell abnimmt, nimmt die Diffusionszeit umgekehrt exponentiell zu, siehe unten Gleichung 24. Im Beispiel von [52] beträgt die Diffusionszeit für einen Mikrometer nur 0,5 ms, für einen Zentimeter jedoch schon 14 Stunden, diese Gegebenheit wird im Folgenden genauer erklärt. [22; 32; 34; 52]

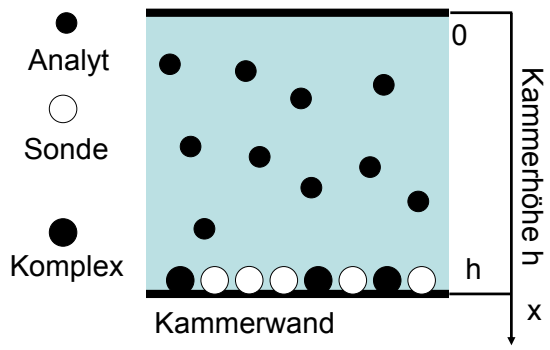


Abb. 17 Fallbeispiel Reaktionskammer [22]
In Lösung befindliche, mobile Analyten reagieren mit einer immobilisierten Sonde in einer Kammer der Höhe h zu einem Komplex.

Bei Immun-Tests (siehe Kapitel 3.5) spielt die Diffusion eine große Rolle. Da die Reaktion von Antigen und Antikörper diffusionslimitiert ist, soll hier noch die Berechnung der Diffusionszeiten für ein System mit Reaktionskammer dargestellt werden. Abb. 17 zeigt den Querschnitt einer solchen Kammer. In der Ausgangsituation werden Analyten eingebracht, deren Sonden an einer Oberfläche angebunden sind, wie es bei Biochips typisch (Kapitel 3.2) ist.

Ziel einer Endpunktreaktion ist das Anbinden möglichst vieler der frei diffundierenden Moleküle mit dem Reaktionspartner, die Ausgangskonzentration c_0 ist c(x,0) mit c(x,t) dem Ort in der Zelle x und der Zeit t. Die Reaktionszeit berechnet sich aus der Summe zweier Phasen mit den Zeiten t_1 und t_2, wie in Gleichung 24 dargestellt.

Gleichung 24 Diffusionszeit für Endpunktreaktionen [22]

$$t_{ges} = t_1 + t_2$$

mit

$$t_1 = \frac{h^2}{4D}$$

und

$$t_2 = \frac{h^2}{2D} \ln\left(\frac{c_0}{c}\right)$$

t_{ges} = Gesamte Diffusionsdauer
$t_{1,2}$ = Diffusionszeiten Phase 1 und 2 [s]
h = Reaktionskammerhöhe [m]
D = Diffusionskonstante [m^2 /s]
c = Konzentration [M]

Als Randbedingung ist für das eindimensionale Modell festgelegt, dass sich die Moleküle nicht einfach an der Zellwand ablagern und gebundene Moleküle nach der Anbindung verschwinden. Da in der Realität Bindungsstellen stark überschüssig sind, d. h. ausreichend Reaktionspartner zur Verfügung stehen, ist dieses Modell durchaus realistisch. Die Phase 1 berechnet die Diffusion der Moleküle $x(t) < h$ und Ausgangskonzentration $c(0,t) = c_0$. Hierbei wird die Diffusion innerhalb der Debye-Länge berücksichtigt. Die Debye-Länge ist die Dicke einer Schicht von wenigen Nanometern, die aus geladenen Molekülen besteht. Die Molekülschicht bildet sich bei Anwesenheit von Salzen aus, wie es bei Immun-Tests auf Grund der Puffer als Lösungsmittel der Fall ist. Die Diffusion läuft in dieser Schicht verlangsamt ab. Phase 2 berücksichtigt die Verarmung der Konzentration in der Zelle mit $c(0,t) < c_0$. Als Grundlage für das Konzentrationsverhältnis c/c_0 wird eine Endpunktreaktion vorausgesetzt, also das Reagieren von 99 % der anwesenden Moleküle. Somit entspricht die gesamte Diffusionszeit t_{ges} der Summe aus t_1 und t_2. Mit einer Diffusionskonstanten eines Antikörpers mit $5x10^{-11}$ m^2/s und einer Zellhöhe von 30 µm liegt die Diffusionszeit bei t_1 = 4,5 s und t_2 = 35,2 s also bei t_{ges} = 39,7 s. Bei einer Zellhöhe von h = 200 µm steigt die gesamte Diffusionsdauer auf t_{ges} = 1765 s, also 29,4 Minuten an. [22]

4.6.2 Dispersion

Das Mischen ist in der Mikrofluidik und für die Anwendung bei Immun-Tests eine wichtige Operation, es wird für zahlreiche Anwendungen benötigt. Für spezielle Testformate, wie den Bindungsinhibitions-Test (siehe Kapitel 3.5.4), ist das Mischen eine Grundvorrausetzung für die Durchführung des Tests. In der Makrofluidik ist das Mischen keine besonders komplexe Handlung. Hier liegen Bedingungen vor, die Turbulenzen erlauben und somit chaotisches Mischen. In der Mikrofluidik kann nicht chaotisch gemischt werden. Die dimensionslose Reynolds-Zahl (Re) hilft diese Tatsache zu beschreiben:

Gleichung 25 Reynolds-Zahl [35]

$\mathrm{Re} = \frac{E_{kin}}{E_{reib}} = \frac{\rho l v}{\eta}$ und $v_{krit} = \mathrm{Re}_{krit} \frac{\eta}{\rho l}$	Re = Reynolds-Zahl [ ] Re_{krit} = Kritische Reynoldszahl [2300] E_{kin}= Kinetische Energie [J] E_{reib} = Reibungsenergie [J] ρ = Fluiddichte [kg/m^3] l = Kanaldurchmesser [m] η = Dynamische Viskosität [kg / ms] v = Fließgeschwindigkeit [m/s]

Re beschreibt das Verhältnis von durch Beschleunigung aufgebauter kinetischer Energie E_{kin} und durch Reibung verlorener Reibungsenergie E_{reib}. Die Re-Zahl ist vom Kanaldurchmesser l, der Dichte ρ und der Strömungsgeschwindigkeit v abhängig. Ab der kritischen Geschwindigkeit v_{krit} geht das laminare Flussregime in ein nicht-laminares Flussregime über, die kritische Re-Zahl Re_{krit} ist mit dem Wert 2300 erreicht. Das bedeutet, dass für $\mathrm{Re} < \mathrm{Re}_{krit}$ ein laminares Flussregime und für $\mathrm{Re} > \mathrm{Re}_{krit}$ turbulente Bedingungen vorliegen. Somit ist in mikrofluidischen Systemen auf Grund meist kleiner Re-Zahlen nur Mischung durch Diffusionsvorgänge (Kapitel 4.6.1) möglich, da keine Turbulenzen entstehen können. [22; 34]

Beispiel: Ein Schlauch hat einen Durchmesser von l = 0,8 mm. Wasser hat die Dichte ρ = 1000 kg/m^3 und die Viskosität η = 0,000998 kg/ms. Das Wasser wird mit der Geschwindigkeit v = 0,021 m/s gepumpt. Dies führt zu Re = 13. Somit herrscht ein laminares Flussregime vor.

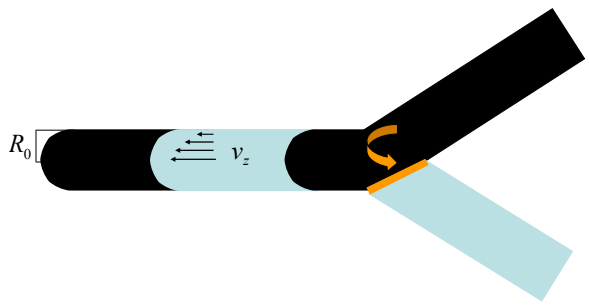


Abb. 18 Taylor-Dispersion mit Multilamination

Ein alternierendes Y-Ventil erzeugt Fluidsegmente, die durch Taylor-Dispersion die Diffusionsbedingungen begünstigen. Das paraboloide Geschwindigkeitsprofil v_z vergrößert die Kontaktoberfläche in einem Schlauch mit Radius R_0.

Um dennoch schnell und effektiv in der Mikrofluidik zu mischen, können u. a. bei druckinduziertem Fluss andere Phänomene genutzt werden. So kann durch das Herstellen von unterschiedlichen Fluidsegmenten in einem Schlauch (Multilamination [53]) ein Mischen induziert werden. In Abb. 18 ist der Vorgang der Multilamination gezeigt. Durch ein alternierendes Y-Ventil werden Fluidsegmente von schwarz und blau dargestellten Fluiden gezeigt, die Erzeugung mehrerer solcher Segmente nennt sich Multilamination. Durch positiv angelegten Druck an den Eingängen des Ventils werden die Fluidsegmente vorwärts transportiert. Der Druck erzeugt ein paraboloides Flussprofil, also bewegen sich die Lamellen in Flussrichtung in unterschiedlichen Geschwindigkeiten.

Gleichung 26 Paraboloides Flussprofil nach Taylor [22]

$$v_z(r) \propto (R_0^{\,2} - r^2)$$

v_z = Flussgeschwindigkeit [m/s]
R_0 = Kanalradius [m]
r = Ort im Schlauch [m]

Für r = R_0 Kanalradius beträgt die Geschwindigkeit $v_z = 0$, während im Zentrum des Schlauchs r = 0 die Geschwindigkeit maximal ist, wie in Abb. 18 schematisch gezeigt ist. Durch dieses erzeugte paraboloide Flussprofil entsteht eine vergrößerte Oberfläche an der Grenzfläche der Fluidsegmente, welche die Diffusion begünstigt. Diese Gegebenheiten sind von Taylor in [54] beschrieben und sind auch unter dem Begriff Taylor-Dispersion bekannt. Durch Verwendung hoher Geschwindigkeiten v_z und durch alternierende Flussrichtung kann der Mischeffekt durch große und sich ändernde Grenzflächen verstärkt werden. Auf der anderen Seite bedeutet dies, dass sich zwei angrenzende Flüssigkeiten in einem Schlauch bei druckinduziertem Fluss immer vermischen. [22; 54]

5 Diagnose

5.1 Sepsis

5.1.1 Definition

Sepsis wird im Allgemeinen als Blutvergiftung betitelt. Das Krankheitsbild kann sich aus einer Infektion entwickeln. Per Definition ist die Sepsis eine Überlagerung einer Infektion mit einem so genannten Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS), wie in Abb. 19 „Definition Sepsis“ zu sehen ist. [55]

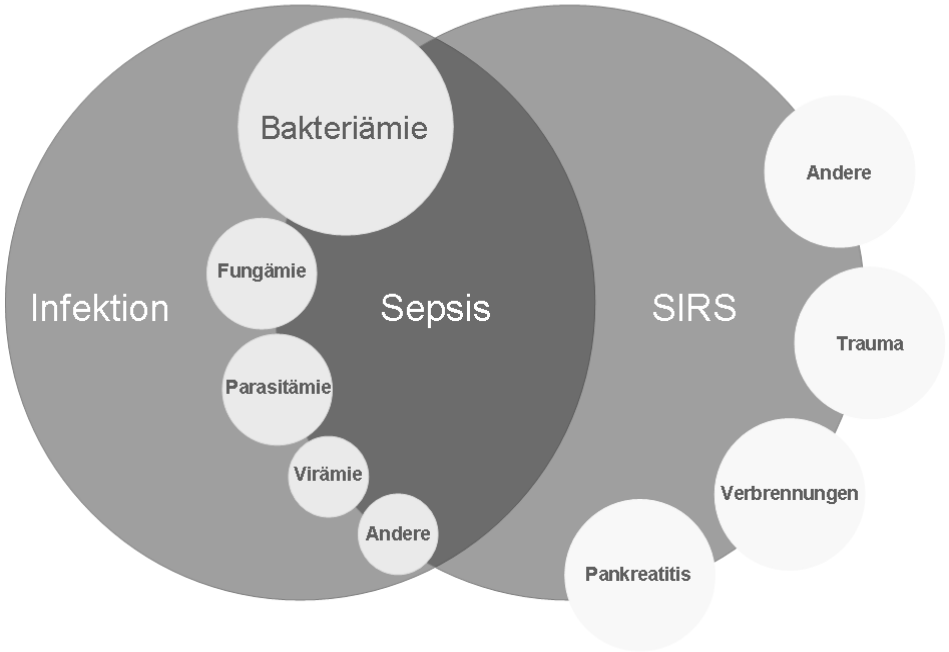


Abb. 19 Definition Sepsis [55]

Überlagerung eines Systemic Inflammatory Response Syndroms (SIRS) mit einem infektiösem Erreger im Blut wird als Sepsis definiert. Erreger können z. B. Bakterien (Bakteriämie), Pilze (Fungämie), Parasiten (Parasitämie) oder Viren (Virämie) sein. Ein reines SIRS kann z. B. Bauchspeicheldrüsenentzündung (Pankreatitis), Verbrennung oder Trauma als Ursache aufweisen.

Ein SIRS ist die Reaktion des Körpers auf eine Entzündung. Dabei ist der Ursprung der Entzündung nicht ausschlaggebend, da der Körper als Ganzes immer identisch auf diesen Stimulus reagiert. Hierbei muss der Auslöser keine Infektion sein, sondern kann auch, wie in Abb. 19 zu sehen ist, Bauchspeicheldrüsenentzündung, Verbrennung oder Trauma als Ursache haben. Ein SIRS ist liegt vor, wenn zwei oder mehr der folgenden Punkte zutreffen:

- Körpertemperatur über 38°C oder unter 36°C
- Herzschlagrate über 90 Schläge/Minute

- Mehr als 20 Atemzüge/Minute, verursacht durch Tachypnoe oder Hyperventilation ($PaCO_2 < 32$ mmHg)
- Änderung der Anzahl der weißen Blutkörperchen über 12 000 oder unter 4000/mm^3 oder mehr als 10% unreife Neutrophile

Die Überlagerung der SIRS mit einem infektiösen Erreger im Blut, wie z. B. Bakteriämie, Fungämie, Parasitämie oder Virämie führt zu Sepsis. Die Endung „ämie“ bezeichnet hierbei, dass sich der Erreger im Blut befindet. Sepsis kann in drei verschiedene Schweregrade unterteilt werden: Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock.

Sepsis:

- SIRS mit Infekt
- Verursacht durch Mikroorganismen im Blut von (Bakterien, Pilzen, Parasiten, Viren, etc.)

Schwere Sepsis:

- Organische Fehlfunktionen, Hypoperfusion, Azidose durch Laktat, Oligurie und Gefühlsschwankungen

Septischer Schock:

- Hypotonie überlagert mit schwerer Sepsis
- Hypotonie: Systolischer Druck unter 90 mmHg oder Abfall um über 40 mmHg von der Basislinie

[5; 55]

5.1.2 Epidemiologie

Die schwere Sepsis hat eine hohe Inzidenz, die mit einer verstärkten Letalität einhergeht. Als Inzidenz bezeichnet man die Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr bezogen auf eine Personenanzahl. Letalität bezeichnet Sterberate in Prozent bezogen auf registrierte Fälle der Inzidenz. In einer aktuellen Studie der Deutschen Sepsis Gesellschaft von 2010 [56] zeigt die Inzidenz einen jährlichen Zuwachs von 13,7 % auf. Laut aktueller Zahlen gibt es in Industriestaaten jährlich 51-95 Neuerkrankungen bezogen auf 100 000 Personen. Die Letalität hat hingegen zwischen 1979 und 2000 von 28 % auf 18 % abgenommen. Verbunden mit der ansteigenden Inzidenz bedeutet dies dennoch eine Zunahme der Anzahl der Todesfälle. In Deutschland streben täglich 162 Menschen und jährlich ca. 60 000 Menschen an einer Sepsis, was somit die dritthäufigste Todesursache darstellt. Sepsis hat verglichen mit Darm- und Brustkrebs eine ca. dreifach höhere Sterblichkeit und stellt eine der häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen dar. [55-57]

5.1.3 Diagnose

Um eine gezielte und erfolgreiche Therapie durchführen zu können, muss bei der Sepsis zwischen SIRS, Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock differenziert werden [4]. Um Sepsis zu diagnostizieren, benötigt es verschiedene klinische Marker. Hierunter ist zu verstehen, dass sich im Blut befindliche Moleküle mit dem Krankheitsbild in Korrelation bringen lassen. Diese sollten sensitiv und spezifisch auf den Verlauf der Sepsis reagieren. Klinisch relevante Parameter hierfür sind das C-reaktive Protein (CRP), Interleukin 6 (IL-6), Procalcitonin (PCT) und Neopterin (NPT) [4; 8; 10; 55].

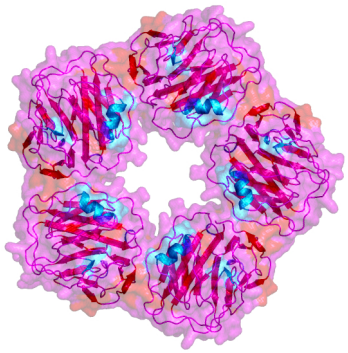


Abb. 20 CRP [58]
Struktur des C-reaktiven Proteins. Das Pentamer ist aus fünf identischen Monomeren aufgebaut.

CRP (Abb. 20) ist ein sehr sensitiver, jedoch unspezifischer Marker für Entzündungen oder Gewebsbeschädigungen. Im Falle einer Stimulierung steigt das CRP von einem physiologischen Wert unter 5000 µg/l über das Tausendfache an, der klinische relevante Messbereich für CRP beträgt 1000 - 500 000 µg/l. Es wird in der Leber produziert, weist eine Halbwertszeit von 19 Stunden auf und gehört zu den Akute-Phase-Proteinen. Das CRP ist im Gegensatz zu anderen Parametern klinisch etabliert und wird bei Routine-Messungen häufig geprüft. CRP ist ein Pentamer, dessen jeweils fünf identische und 23 kDa schwere Monomere nicht kovalent um eine zentrale Pore angeordnet sind. CRP hat als Marker der Sepsis zu geteilten Meinungen in wissenschaftlichen Studien geführt. Jedoch kann es in Verbindung mit PCT helfen, zwischen viralen und bakteriellen Infektionen zu unterscheiden, wie weiter unten noch genauer beschrieben wird, zudem ist es ein klinisch etablierter Parameter. In der aktuellen Leitlinie von 2010 der Deutschen Sepsis Gesellschaft [5] wird unter anderem empfohlen, bei Erhöhung der CRP-Werte Blutkulturen anzusetzen. [4; 11; 12]

Procalcitonin ist die Vorstufe des Hormons Calcitonin, welches in der Schilddrüse gebildet wird. Die Halbwertszeit beträgt 24 Stunden, die physiologische Konzentration weniger als 0,1 µg/l und kann über das Tausendfache im Falle einer schweren Sepsis ansteigen. Der klinisch relevante Messbereich liegt zwischen 0,05-50 µg/l. Es wird über eine enge Korrelation des Schweregrades der Sepsis mit PCT-Konzentration berichtet. Im Falle eines entzündlichen Stimulus durch Viren verweilt PCT im Normbereich, während IL-6 und CRP unspezifisch ansteigen, daher kann der Parameter in Verbindung mit CRP oder IL-6 zur Unterscheidung zwischen einer bakteriellen und viralen Infektion herangezogen werden. PCT steigt auch bei Infektionen mit Pilzen, Parasiten oder multiplem Organversagen an. In der aktuellen Leitlinie von 2010 der Deutschen Sepsis Gesellschaft [5] wird „der frühzeitige Nachweis von PCT im Serum zum Ausschluss einer schweren Sepsis bzw. zur Sicherung der Diagnose“ empfohlen. Generell wird PCT eine

höhere Sensitivität für die Diagnose von Sepsis zugesprochen und es weist eine schnellere Nachweisbarkeit auf als CRP. Die Möglichkeit der Diagnose des Schweregrads einer bakteriellen Sepsis ist klinisch nachgewiesen. [4; 10; 12]

Abb. 21 IL-6 [58]
Das Interleukin-6 ist ein Botenstoff von Zellen, der die Produktion von CRP in der Leber stimuliert.

Das IL-6 (Abb. 21) ist der Stimulus für die Bildung des CRP. Daher reagiert dieser Marker auch am schnellsten auf akute, entzündliche Prozesse. Generell sind Interleukine die Botenstoffe von Zellen, IL-6 wird daher von mehreren verschiedenen Zell-Typen exprimiert und regt Leberzellen zur Produktion von CRP an. Des Weiteren ist die Bildung von CRP bei Neugeborenen unvollständig ausgebildet, weswegen hier das IL-6 als Ersatzparameter herangezogen wird. Außerdem korreliert der Schweregrad des Infektes mit der systemischen Konzentration des Interleukins. Für IL-6 beträgt die Halbwertszeit wenige Minuten, die molekulare Masse 30 kDa, die physiologische Konzentration weniger als 0,01 µg/l und der klinische Messbereich liegt zwischen 0,04 und 1,5 µg/l. [4; 8; 9]

NPT ist eine niedermolekulare Substanz mit nur 253,2 Da und als einziger der aufgeführten klinischen Marker kein Protein. Es ist inert und kann nur renal aus dem Körper ausgeschieden werden. Generell gibt NPT Auskunft über die Zellaktivität und wird von Monozyten und Makrophagen gebildet, daher besteht die Korrelation zur Erkrankung. Die genannten exprimierenden Zell-Typen treten hauptsächlich bei infektiösen Stimuli vermehrt auf. In Zusammenhang mit CRP ist die Differenzierung zwischen viralen und bakteriellen Infektionen möglich, durch Bildung eines Quotienten zwischen CRP und NPT. Bei Patienten mit septischem Schock steigt die Konzentration des NPT signifikant höher an, als bei Patienten mit nicht-infektiöser SIRS. Laut klinischen Studien steigt das NPT auf einen 2-fach höheren Wert im Zusammenhang mit einer viralen Infektion als bei bakteriellen Erregern als Ursache an. [4; 6; 7; 59]

Zusätzlich zu den genannten klinischen Markern werden die physiologischen Parameter wie Temperatur, Blutdruck, etc. zu Rate gezogen, um die Diagnose zu stellen [5]. Durch die quantitative Messung der Parameter können zusammengefasst folgende Aussagen getroffen werden [4; 60]:

Tabelle 2 Diagnose mit klinischen Parametern

Parameter	Konzentration [µg/l]	Diagnose
CRP	> 40 000	Bakterielle Sepsis wahrscheinlich.
PCT	< 0,1 < 0,25 0,25 - 5,5 0,5 - 2 2 - 10 > 10	SIRS ohne Infekt oder virale Sepsis. Bakterielle Infektion unwahrscheinlich. Bakterielle Infektion möglich. Sepsis möglich. Lebensbedrohliche Sepsis wahrscheinlich. Bakterielle Sepsis wahrscheinlich.
IL-6	> 1 < 1	Mortalität: 47,1% Mortalität: 26,8 % → Frühmarker für Komplikationen
NPT	> 2,5 CRP/NPT < 3 [mg/nmol]	Multiples Organversagen möglich. Viraler Infekt wahrscheinlich.

5.2 Patientennahe Diagnostik

In speziellen Fällen kann es für einen Patienten vorteilig sein, dass die nötige Diagnose vor Ort getroffen wird. Das ist vor allem dann der Fall, wenn das Testergebnis besonders schnell benötigt wird. Für solche Diagnostika, die vor Ort eingesetzt werden, spricht man von patientennaher Diagnostik oder auch von Point-of-Care-Testing (POCT). Der große Unterschied zur konventionellen Labor-Diagnostik, welche in großen Zentrallaboren von Kliniken etabliert ist, ist die Dezentralisierung dieser Labore durch Tests mit neuen, kompakten und kostengünstigen Verfahren vor Ort beim Patienten. Jedoch kommt POCT auch innerhalb der Kliniken zum Einsatz.

POCT im Krankenhaus ist definiert als [3]:

- Patientennaher Test
- mit einfachen Systemen
- im Rahmen der unmittelbaren Krankenhausversorgung
- bei vital bedrohten Patienten mit direkter Therapierelevanz
- durch Anwender oder den Patienten selbst ohne eingehende medizinisch-technische Ausbildung im Bereich der Labormedizin
- in Räumlichkeiten der bettenführenden Abteilungen, z. B. direkt am Krankenbett, im Operationssaal oder auch in der Ambulanz.

Ein weiteres Anwendungsgebiet von POCT fern vom Krankenhaus ist der Selbsttest. Die weitaus verbreitetste Anwendung ist hierbei die Messung von Glukose-Werten zur Behandlung des Diabetes mellitus durch Insulininjektionen. Den größten Profit hat der Patient vom POCT dann, wenn unmittelbar aus der Diagnose eine Therapie erfolgt.

Der Zeitaufwand bis zum diagnostischen Bericht wird Therapeutic-Turn-Around-Time (TTAT) genannt. Die TTAT wird nachweislich durch POCT reduziert. Der zeitliche

Gewinn lässt sich hauptsächlich auf die Tatsache zurückführen, dass die Patientenprobe (z. B. Vollblut, Speichel, Urin etc.) direkt im System aufbereitet, analysiert und die Diagnose ausgegeben wird, ohne dass die Probe in Zentrallabore geschickt werden muss.

Auch für das Krankheitsbild Sepsis (siehe Kapitel 5.1) ist eine solche Reduktion der TTAT absolut wünschenswert und kann für den Patienten über Leben und Tod entscheiden. In einer Studie von Siemens [1] wird dieser Zustand bestätigt. Es wird berichtet, dass die Überlebenschance eines septischen Patienten jede Stunde um 6 % sinkt.

Der Markt von POCT lässt sich in folgende Segmente aufteilen [61]:

- Diabetes mellitus
- Koagulation
- Kardiovaskuläre Diagnostik
- Hämatologie
- Schwangerschaftstests
- Infektionskrankheiten

Die Summe dieser Segmente wiesen im Jahr 2005 einen Wert von 754,4 Millionen US$ auf. Das Wachstum soll bis 2012 auf 1,6 Milliarden US$ ansteigen, was einer jährlichen Wachstumsrate von 10,9 % entspricht. Zusammengefasst ist die patientennahe Diagnostik eine sich etablierende Methode, die sowohl gesellschaftlich durch verbesserten medizinischen Standard, als auch wirtschaftlich sehr profitabel ist. [2; 3; 61]

6 Stand der Technik

6.1 Systeme

6.1.1 Kommerzielle patientennahe Diagnostika

In Tabelle 3 ist eine Auswahl von POCT-Systemen beschrieben. Da die Anzahl der Anbieter groß ist, beschränkt sich die Tabelle auf eine spezielle Auswahl von POCT-Systemen. Für die Eingrenzung werden folgende Kriterien festgelegt: Das System basiert auf Protein-Tests und beinhaltet mindestens einen sepsisrelevanten Parameter. Alle genannten Systeme verwenden Serum, Plasma oder Vollblut als Probe. Die genannten Charakteristika wurden den Produktdatenblättern entnommen.

Tabelle 3 Kommerzielle patientennahe Diagnostika

Unternehmen	System	Anwendung	Multi-parameter	Proben-volumen	Dauer
Afinion	AS 100 Analyzer	CRP-Test mit Kartusche	nein	1,5 µl	4 min
Biomed	smart 546, 700/340 und 700	CRP und hsCRP (hoch sensitives CRP) auf Streifentest	nein	5µl	2,5 min
BodiTech Med Inc.	i-Chroma	Kartusche u. a. für hsCRP und CRP	nein	5-30 µl	3 min
HORIBA ABX Diagnostics	ABX Micros CRP 200	Hämatologie (18 Parameter) mit CRP	ja	18 µl	5min
Incomat Medizinische Geräte	Cholestech LDX	Streifentests und Schnelltestgeräte hsCRP	nein	50 µl	5 min
Milenia Biotec	PicoScan	IL-6, IL-8 mit Streifentests	nein	50 µl	max. 30 min
Mitsubishi Chemical Europe	Pathfast	6 Parameter (Streifen) gleichzeitig u. a. für hsCRP	ja	100µl pro Streifen	17 min
PROGEN Biotechnik GmbH	NycoCard Reader II (Halbautomat)	CRP-Test, offenes Testareal	nein	5 µl	Ca. 2 min
Radiometer	AQT90 FLEX	CRP und 7 andere	ja	2 ml	18 min
Randox	Evidence Investigator (Halbautomat)	IL-6 und 12 andere Interleukine	ja	100 µl	18 min
Sysmex	Eurolyser SMART 546	CRP, hsCRP in Küvette	ja	5 µl	3 min

Wie der Tabelle 3 zu entnehmen ist, sind bereits einige POCT-Systeme mit sepsisrelevanten Parametern kommerziell erhältlich. Auffällig ist, dass nur wenige Systeme Multiparameter-Tests prozessieren können, Streifentests sind hier im Allgemeinen besonderes limitiert. Zwar können manche Systeme mehrere Streifen parallel messen, jedoch steigt dadurch das benötigte Probenvolumen stark an. Unter den Systemen befinden sich auch Halbautomaten, die die Handhabung in Notfallsituationen erschweren könnten. Als Halbautomaten werden Systeme definiert, die manuelle Handlungen innerhalb der Messung benötigen. Keines der Systeme ist in der Lage PCT oder NPT zu messen, was essentiell für die Sepsisdiagnose wäre. CRP ist ein stark vertretener Parameter, da es klinisch etabliert ist und zur Diagnose von kardiovaskulären Krankheiten oft analysiert wird. In Europa sind bereits 20 % aller diagnostischen Tests auf Basis von

POCT. Die Sparten Immunassay und Klinische Chemie haben dabei den stärksten Anteil. Die Diagnostik für Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Krankheiten sind dabei die umsatzstärksten Anwendungen. Die Diagnose von Sepsis spielt bisher eine untergeordnete Rolle für POCT, die Limitierungen der bereits erhältlichen kommerziellen Systeme wurden genannt, daher besteht an dieser Stelle noch Forschungsbedarf. [61]

6.1.2 Kommerzielle Biochipreader

Neben den etablierten POCT Systemen in Kapitel 6.1.1 gibt es auf dem Markt auch eine Reihe von Biochipreadern. In Abb. 22 sind die gängigsten Techniken zur Signalerfassung von Mikroarrays dargestellt.

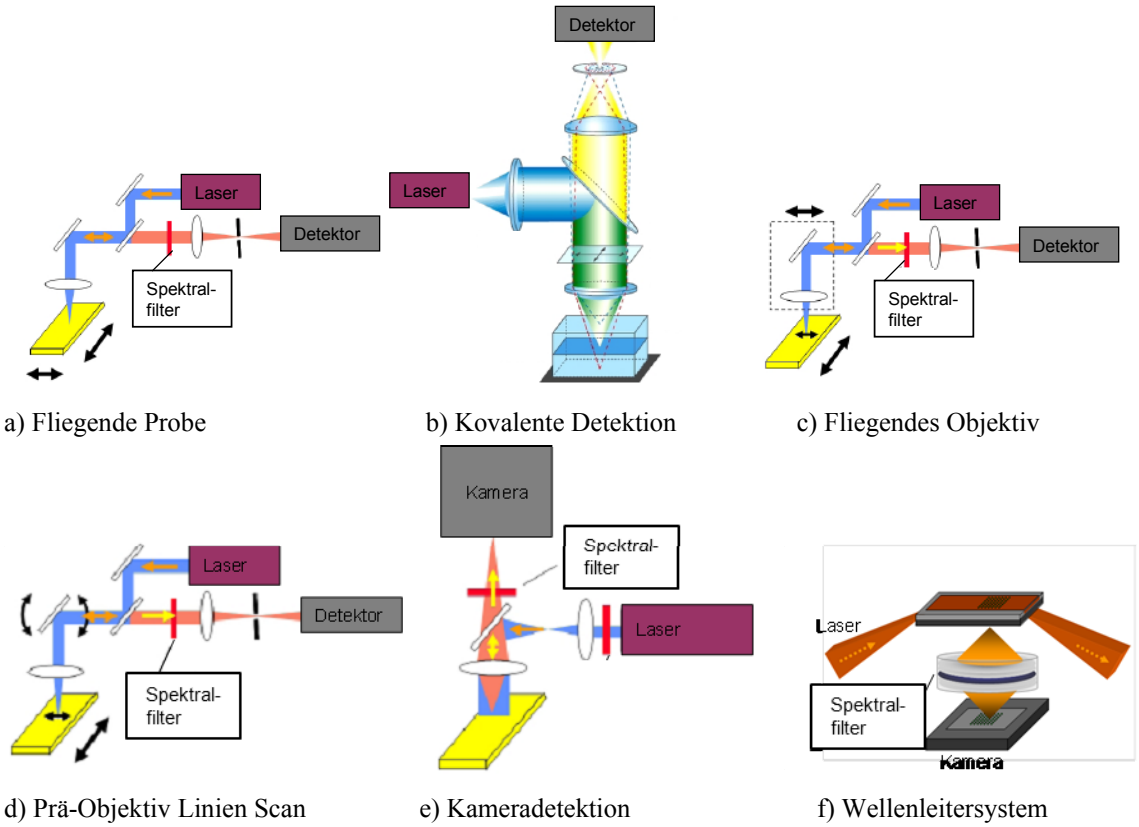


Abb. 22 Detektionsprinzipien von Biochipreadern [36]

Im Allgemeinen verwenden alle Biochipreader eine Anregungsquelle, wie z. B. einen Laser. Das Anregungslicht wird von der Fluoreszenz durch einen Spektralfilter getrennt. Hierbei ergeben sich von der Art des Aufbaus die sechs unterschiedlichen Prinzipien von a) - f).

Das Grundprinzip einer Aufnahme ist bei allen Techniken identisch: Eine Lichtquelle regt die Probe an, das Anregungslicht wird von der Fluoreszenz getrennt und über einen Detektor aufgenommen. Hauptunterschiede liegen vor allem bei der Aufnahme. Es kann zwischen abbildenden und scannenden Readern unterschieden werden. Scannende Verfahren rastern die Probe ab, die einzelnen Scan-Punkte werden für gewöhnlich über einen Photomultiplier aufgenommen und zu einem Bild zusammengesetzt

(Abb. 22 a, c, d). Im Gegensatz dazu wird bei abbildenden Verfahren eine Kamera eingesetzt, die durch optische Komponenten das Bild auf einen CCD Chip direkt abbildet (Abb. 22 b, e, f). Somit kann das Array im Ganzen aufgenommen werden, was zeitliche Vorteile mit sich bringen kann. Im Gegensatz hierzu haben scannende Verfahren den Vorteil, dass es kein Überleuchten von Mikrospots gibt und somit der Hintergrund niedrig und rauschfreier ist. In Tabelle 4 sind führende Anbieter von Mikroarray-Readern aufgelistet.

Tabelle 4 Kommerzielle Biochipreader [62; 63]

Anbieter	Name	Beschreibung
Affymetrix	Affymetrix GeneChip Scanner	Scanner, Prä-Objektiv Linien Scan
Agilent Technologies	DNA-Mikroarray Scanner	Scanner 0,05 Fluochrome/μm^2
Applied Precision	Array Worx	Kameradetektion, scannend Unter 0,1 Fluochrome/μm^2
Bio-Rad	VersArray ChipReader	Konfokaler Scanner
Genetix	AQuire	Scanner Detektion > 0,1 Fluochrome/μm^2
LaVision BioTec	Bioanalyzer	Kameradetektion, scannend
Molecular Devices Corperation	Axon Genepix	Scanner, fliegendes Objektiv 0,1 Fluochrome/μm^2
PerkinElmer Life & Analytical Sciences	ScanArray GX, PlusProScanArray, ProScan-ArrayHT	Scanner Besser 0,1 Fluochrome/μm^2
Tecan	LS Reloaded	Scanner 0,1 Fluochrome/μm^2
Zeptosens	ZeptoREADER	Wellenleitersystem 10 pg Protein/mL

In Tabelle 4 ist zu sehen, dass die scannenden Verfahren weiter verbreitet sind, als die auf Kamera basierenden. Auch ein Wellenleitersystem, mit sehr ähnlicher Technik zum in dieser Arbeit vorgestellten System ist mit dem ZeptoREADER von Zeptosens kommerziell erhältlich. Die Anwendung dieses Readers ist für die Forschung gedacht, daher sind Preis und Automatisierung des Systems nicht für POCT ausgelegt. Diese Tatsache trifft auch für alle anderen genannten Systeme zu. Sie unterscheiden sich zu den POCT-Systemen aus Tabelle 3 und dem System in dieser Arbeit hauptsächlich darin, dass sich deren Funktion auf die Signalerfassung von Mikroarrays beschränkt. D. h. es gibt keine Probenzufuhr bzw. Fluidik und somit ist kein Durchführen eines automatisierten Immun-Tests möglich.

6.1.3 Limitierungen

Die Vorschriften bezüglich Präzision und Genauigkeit der FDA „Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation“ [14] lassen sich mit Biochips auf Mikroarray-Basis nicht einfach erfüllen. Aus Quelle [64] geht hervor, dass die Ergebnisse der kommerziell erhältlichen Biochipplattformen von Fluoreszenz-Messungen mit DNA-Tests variieren. Die Varianz rührt von den Plattformen selbst, der Prozessierung und den analytischen Schritten her.

In Quelle [65] wird die Limitierung von Messungen mit DNA-Arrays ähnlich beschrieben. Allgemein wird hier die Quantifizierung von Konzentrationen von Genen als schwierig angesehen, im Speziellen die von sehr kleinen Mengen. Diese werden mit der Mikroarraytechnologie nicht akkurat aufgelöst. Die Verbesserung von Herstellungsmethoden für Biochips, deren Detektionsgeräten und die Testbedingungen müssen gewährleistet werden. Auch der Einsatz von geeigneten Referenzen und Standard-Protokollen wird als Lösung des Problems vorgeschlagen.

In [66] wird die Qualität der Reproduzierbarkeit von Daten der Gen-Expression als kritisch angesehen und in [67] wird eine Standardisierung von verschiedenen Reader-Systemen für DNA-Mikroarrays gefordert, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu schaffen.

In der Literatur ist ersichtlich, dass es mehr Forderungen zu DNA- als zu Protein-Arrays gibt. Grund hierfür ist, dass DNA-Arrays weitaus etablierter sind und nicht, weil diese Tests qualitativ schlechter als Protein-Formate sind. Doch auch für Protein-Arrays sind kritische Erkenntnisse gewonnen worden.

In [68] wird eine Quantifizierung mit Protein-Arrays als schwierig bezeichnet. Nur wenige Anbieter haben hierfür Standard- oder Kalibrier-Chips mit definierten Fluoreszenzsignalen im Angebot, darunter z. B. Fullmoon Biosystems, Clondiag Chip Technology, Fuji Photo Film und Axon Instruments. Diese Standards sind nötig, um Langzeitstabilität bei der Signalerfassung zu gewährleisten. In der Quelle wird eine Standardisierung der Instrumente, der Protokolle, der Tests und die Etablierung geeigneter Referenzmaterialien gefordert.

In [69] wird anhand von fünf verschiedenen Risikomarkern für kardiovaskuläre Krankheiten (darunter auch CRP) beschrieben, dass speziell für die parallele Messung mehrerer Parameter Kreuz-Reaktivitäten auftreten. Diese müssen notwendigerweise unterbunden und erkannt werden.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass eine Standardisierung und Referenzierung von Mikroarray-Daten absolut notwendig ist, um quantitativ zu messen. Im Bereich der Diagnostik würden fehlerhafte Ergebnisse gravierende Folgen für den Patienten haben. Ohne diese Maßnahmen sollten Protein- oder DNA-Mikroarrays nicht für diagnostische Zwecke verwendet werden. Dennoch weisen alle in diesem Kapitel aufgezählten Quellen der Mikroarray-Technologie ein immenses Potential zu, wenn diese Hürden genommen sind.

6.2 Immun-Tests

6.2.1 Immun-Tests für patientennahe Diagnostik

In diesem Kapitel werden veröffentlichte Ergebnisse zu Methoden für Immun-Tests für patientennahe Diagnostik auf Einhaltung folgender Kriterien geprüft: Testzeit, Probenvolumen, Multiparameter, Reproduzierbarkeit, Sensitivität oder Automatisierungsgrad.

Eine gleichzeitige Detektion von diagnostisch relevanten Parametern für kardiovaskuläre Krankheiten durch Fluoreszenz-Immunassays auf Basis von Mikroarrays wurden in [70] gezeigt. Mit drei Stunden Inkubationsphase übersteigt diese Testzeit jedoch die Ansprüche von POCT. Unter anderem wird das CRP gemessen. Die Mikroarrays werden in einem kommerziellen Reader analysiert und manuell prozessiert, sind somit für POCT nicht geeignet.

In [71] werden auch relevante Parameter für kardiovaskuläre Krankheiten, mitunter das CRP, mit Immunfluoreszenz-Tests auf Basis von Mikromosaik-Elementen einzeln gemessen. Durch mehrere verfügbare Elemente können seriell mehrere Parameter gemessen werden. Das verwendete Probenvolumen mit nur 1 µl pro Element und die Testzeit erfüllt mit 10 Minuten ein wichtiges POCT-Kriterium. Da sich die Arbeit auf das „Proof of Principle“ der vorgestellten Methode konzentriert, werden Kriterien bezüglich Reproduzierbarkeit und Automatisierungsgrad noch nicht erfüllt. Die Sensitivität mit einem Detektionslimit für CRP = 30 µg/l liegt durch Verdünnung im klinischen Bereich, jedoch für IL-6 oder PCT wäre dieses Detektionslimit zu hoch.

In [72] wird ein System präsentiert, das CRP sowohl als bindungsinhibitierenden als auch im nicht-kompetitiven Test schnell und automatisch misst. Auch weitere Analyten sind rein technisch parallel messbar. Das Gerät ist sensitiv mit einem Detektionslimit für CRP im nicht-kompetitiven Test mit LOD = 1,3 µg/l und im bindungsinhibitierenden Test mit LOD = 0,55 µg/l. Die Testzeit beträgt nur 12 Minuten und das Probenvo-

lumen, das um Faktor 1:100 verdünnt wird, bei 4-9 µl und somit für CRP im klinisch relevanten Bereich liegt. Ob dieses Protokoll für IL-6 oder PCT funktionell ist, wäre zu prüfen.

In [73] ist ein System auf Basis der Messung der Fluoreszenz in Kapillaren vorgestellt. Das System misst PCT und CRP. Es kann mehrere Parameter innerhalb von ca. 20 Minuten messen, in getrennten Kapillaren. Die Detektionslimits von CRP = 0,8 µg/l und PCT = 2 µg/l sind sensitiv, wenn auch für PCT noch nicht ausreichend. Das System ist automatisiert, die Reproduzierbarkeit wurde an dieser Stelle nicht untersucht.

In [74] wurden unter anderem die Parameter CRP und IL-6 auf einem Multiparameter-Biochip für die Diagnose von schwarzem Hautkrebs (maligne Melanomen) gezeigt. Die Testzeit liegt zwischen 2,5-3,5 Stunden. Der mit Epoxid beschichtete Objektträger wird manuell außerhalb eines Geräts prozessiert und in einem kommerziellen Laserscanner analysiert. Für CRP wird ein LOD von 0,188 µg/l erreicht und für IL-6 von 0,0031 µg/l, beide Parameter im nicht-kompetitiven Format prozessiert. Die LOD beziehen sich auf die Konzentration des Parameters nach einer Verdünnung von 1:10 in Serum. Die Variationskoeffizienten sind mit < 20 % angegeben. Die Arbeitsgruppe des Austrian Institute of Technologie liefert auf Basis der Oberflächenchemie die Grundlage für Protokolle für die Durchführung von Immun-Tests auf Multiparameter-Biochips in dieser Arbeit. Hauptsächliche Limitierung dieser Art von Durchführung für POCT ist der geringe Automatisierungsgrad und die benötigte Testzeit.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Durchführung von Multiparameter-Tests für klinische Anwendungen generell möglich ist. Meistens ist jedoch die Reproduzierbarkeit, die Sensitivität oder die Testzeit die Limitierung für eine POCT-Anwendung, bei der all diese Kriterien erfüllt werden müssen.

6.2.2 Methoden für Tests mit Referenzierung

In den folgenden Absätzen werden Arbeiten mit DNA- und Protein-Tests in Verbindung mit Referenzierungsmethoden vorgestellt. Die Inhalte werden mit Bezug zur patientennahen Diagnostik beurteilt.

In Quelle [75] wird eine geeignete Berechnung einer Normierungsmethode von fluoreszierenden DNA-Mikroarrays vorgestellt. Durch gleichzeitiges hybridisieren einer Referenz-cDNA kann die eigentliche Ziel-cDNA referenziert werden.

Auch in [76] wird eine Methode zur Normierung von cDNA-Mikroarrays gezeigt, mit beigesetzter Referenz-cDNA. Die Referenz löst Variationen während des Spottings und der Hybridisierungsphase auf und kann diese korrigieren.

In Patent [77] wird eine Referenzreaktion innerhalb der Mikrospots integriert, die mit einem anderen Farbstoff als der eigentliche Test markiert sind. Die Bildung des Quotienten referenziert das Testsignal. Die Farbstoffe sind Texas red mit Absorptionsmaximum bei 586 nm und Fluorescein mit Absorptionsmaximum bei 485 nm. Der Test wird auf DNA-Basis gezeigt. Es wird eine Verbesserung von Replikatsmessungen von 34 % ± 21 % auf 15 % ± 6 % berichtet. Für diese Farbstoffe ist es notwendig zwei Lichtquellen zur Anregung der Farbstoffe zu verwenden. Diese Tatsache macht die Verwendung mit dem Welleiterchip in dieser Arbeit praktisch nicht anwendbar. Eine zweite Lichtquelle müsste neu in den Chip eingekoppelt werden, was die Referenzierung fehleranfällig machen würde, da neue Koppel- und Ausleuchtungsfehler entstehen. Zudem kann durch optische Limitierungen nicht jede beliebige Wellenlänge in den Chip eingekoppelt werden.

Für Methoden im Bereich der Proteomics, werden die Messsignale wie in Quelle [44] durch direkt immobilisierte und markierte Antikörper durch Bildung des Verhältniswerts normiert. Die beschriebene Technologie ist auf Basis von Wellenleiterchips und der Parameter IL-6 auf dem Mikroarray integriert. Für das IL-6 wurde ein Quantifizierungslimit von 0,05 µg/l in Serum erreicht, eine Spot-zu-Spot Variation kleiner 10 % und Chip-zu-Chip nach dem Rückrechnen des Fits eine Variation < 20 %. Diese Kenndaten sind überzeugend, jedoch liegt die Testzeit mit ca. drei Stunden wiederum deutlich über den Anforderungen für POCT. Auch über eine Referenzierungsmethode wird berichtet, die auf der Bildung von Quotienten von Referenz- und Messsignal beruht, jedoch handelt es sich hierbei nicht um eine Referenzreaktion, sondern um direkt immobilisierte Cy5 Farbstoffe an bovine serum albumin auf den Chip. Der Verbesserungsfaktor durch Referenzierung beträgt 6 %. Da keine Reaktion als Referenz verwendet wird, werden Variationen bei der Inkubation oder bei einer theoretischen Anwendung einer Fluidik nicht aufgelöst.

Eine interne Kalibration wurde in [78] beschrieben. Hier wurde durch das Spotten von prostataspezifischen Antigenen (PSA) eine interne Kalibration für einen nicht-kompetitiven PSA Test gezeigt. Die Auswertung zur Bestimmung der Proteinkonzentration hat sich einfach gestaltet und das Prinzip wurde als eine gute Grundlage für diagnostische Anwendungen vorgeschlagen. Eine wichtige Information ist, dass das Signal einer direkt immobilisierten Menge an Antigenen nicht direkt identisch zum Signal des nicht-kompetitiven Tests mit identischer Antigenkonzentration ist. Dies kann aber durch einen Umrechnungsfaktor gelöst werden. Es wird von einem Variationskoeffizient von 10 % nach der Referenzierung berichtet. Die Testzeit liegt mit ca. 19 Stunden jedoch unter den Anforderungen für POCT.

In [79] wird eine interne Normierung durch BSA Konjugat in einer Konzentrationsreihe durch BCA Protein (Pierce) als Referenz-Test durchgeführt. Zusätzlich ist eine interne Kalibrierung durch rekombinante Proteine aufgebracht, die in einer Konzentrationsreihe

angeordnet sind. Detektion erfolgt im nahinfraroten Bereich, u. a. mit FastGreen FCF als Farbstoff. Die erreichten Variationskoeffizienten dieser Methode sind mit < 5 % für Chip-zu-Chip und Spot-zu-Spot sehr gut. Wichtig ist, dass bei dieser Technik die Probe gespottet ist. Somit ist diese Art von Testformat für die Diagnose von Sepsis nicht geeignet, zusätzlich ist die Funktion des Farbstoffs bei Zusätzen von EDTA in der Probe gehemmt. Dies könnte zu Problemen bei der Messung von Blutproben führen, die häufig EDTA als Gerinnungshemmer beinhalten.

In Patent [80] wird eine Methode mit zusätzlichen Referenz-Spots in einem Mikroarray gezeigt. Hierbei wird ein nicht-kompetitiver Test mit einer nicht-kompetitiven Referenzreaktion verrechnet. Für den Test mit Interleukin 8 ist eine Verbesserung des Variationskoeffizienten von 35,1 % auf 12,7 % bei n = 16 Replika gezeigt. In der Realität könnte dieser Test nicht durchgeführt werden, da die nicht-kompetitive Referenzreaktion auf dem Protein TNF-alpha aufgebaut ist. TNF-alpha ist wie Interleukin 6 ein Zytokin, das bei entzündlichen Prozessen vermehrt von verschiedenen Zell-Typen exprimiert wird. Also handelt es sich um einen klinischen Parameter, der im Falle einer Sepsis ansteigen kann. Jedoch zeigt diese Methode, dass das Potential zur Referenzierung mit einem nicht-kompetitiven Test hoch ist. Für POCT müsste jedoch ein geeigneter, unabhängiger Test gefunden werden.

Zusammengefasst tragen die vorgestellten Referenzmethoden zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit von Signalen von Mikroarrays bei. Die Methoden ermöglichen durch eine Referenzierung eine Korrektur der Signale bezüglich in der Messung auftretender Fehler. Alle geschilderten Methoden können für die Anwendung mit einem Wellenleitersystem oder für POCT aus beschriebenen Gründen nicht direkt verwendet werden.

III Experimentelles

Die Grundlage für die Messungen am vorgestellten POCT-System sind die planaren Wellenleiterchips, die in Kapitel 4.2 beschrieben sind. Für die Funktionalisierung bis hin zu einem Biochip werden die Chips mehreren Prozessschritten unterzogen, die im Folgenden beschrieben sind. Im Anschluss werden das Biochip-System und verwendete Messaufbauten erläutert. Eine detaillierte Liste der verwendeten Reagenzien ist im Anhang in Tabelle 18 zu finden.

7 Herstellung von Biochips

7.1 Reinigung der Wellenleiterchips

Der erste Prozessschritt ist die Reinigung, welche speziell für die Wellenleiterchips (Oerlikon Corporate, Pfäffikon, Schweiz) entwickelt wurde. Dabei sind die Reagenzien so gewählt, dass eine möglichst saubere, für die Lichtleitung dämpfungsfreie und homogene Oberflächencharakteristik entsteht.

Reinigungskaskade:

- Chips in den vorgesehenen Chiphalter einlegen
- Spülen mit di-H_2O
- 35 min im Ultraschallbad in 0,5% (v/v) Hellmanex II (Fa. Hellma, Müllheim)
- Spülen mit di-H_2O
- 25 min im Ultraschallbad in di-H_2O
- Trocknen der Chips mit Stickstoff

7.2 Tauchbeschichtung mit Epoxidharz

Nach der oben beschriebenen Reinigung ist es vorteilhaft, die Wellenleiterchips direkt weiter zu verarbeiten, um das Ansetzen von neuem Schmutz aus der Umgebung zu minimieren. Für die Tauchbeschichtung dürfen sich keine Schmutzpartikel auf der Oberfläche befinden, da diese sonst eine inhomogene Beschichtung verursachen. Die planaren Wellenleiterchips sind empfindlich im Hinblick auf die optische Qualität der aufgebrachten Schicht, daher sind nur homogene und dünne Schichten für eine weitere Verarbeitung geeignet.

Das Tauchbeschichten dient der Oberflächenfunktionalisierung der Wellenleiterchips mit einem Epoxidharz (Epon Resin SU-8, Hexion, Rotterdam, Niederlande) [27]. Die Parameter für das Tauchbeschichten und die Funktionalisierung mit Epoxidharz sind Entwicklungen des Austrian Institute of Technology, Seibersdorf. Die Funktion der

aufgetragenen Schicht besteht darin, Proteine kovalent an die Oberfläche zu binden. In Kapitel 3.3 „Oberflächenfunktionalisierung für Biochips“ wird dieser chemische Vorgang detailliert beschrieben.

Das Epoxidharz liegt in kristallener Form vor und wird in Methyl-ethyl-keton (Fa. Sigma-Aldrich, Nr. 230294) zu 1 % (w/w) gelöst. Für die Tauchbeschichtung wird ein Halter für 10 Wellenleiterchips verwendet, dies verschafft eine höhere Parallelität und Reproduzierbarkeit bei der Herstellung der Schichten. Zusätzlich hat es sich bewährt, die gesamte Apparatur unter Stickstoffatmosphäre zu setzen, dies sorgt für eine konstante Temperatur bei 20 °C und 20 % Luftfeuchtigkeit. Die Ein- und Auftauchgeschwindigkeit beträgt 1,66 mm/s und die Haltezeit in der Epoxidlösung beträgt 60 s. Beschichtete Chips sollten trocken und dunkel bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

7.3 Chips zur Charakterisierung der Optik-Einheit

Für die Bestimmung des Detektionslimits und des dynamischen Messbereichs der Optik-Einheit ohne Einfluss des Immun-Tests werden aminoreaktive Farbstoffe durch Spotting direkt auf dem Chip auf einer Aminosilanoberfläche immobilisiert. Hierfür wird nach der Waschroutine die Oberfläche mit O_2-Plasma aktiviert. Anschließend wird das 3(-2-Aminoethylamino)-propyltrimethoxysilan (Sigma Aldrich) im Verhältnis 1:200 in Aceton gemischt und 20 µl unter Acetonathmosphäre für 10 Sekunden auf den Wellenleiterchip pipettiert. Daraufhin werden die Reste mit Aceton abgespült. [81]

Nach dem Trocknen mit Stickstoff werden die Chips mit dem aminoreaktiven Alexa Fluor 647 succinimidyl ester (Invitrogen) bespottet [33], welcher mit dem Aminosilan eine kovalent Bindung eingeht. Der Farbstoff wird in Dimethylsulfoxid 99,5 % (Sigma Aldrich) in gewünschter Konzentration angemischt.

Für die Bestimmung des Detektionslimit werden die beschichteten Wellenleiterchips in einem 8x10 Mikroarray in einer Verdünnungsserie von 1:5 ab $4x10^{-9}$ M im Qarray mini von Genetix mit dem Stealth Pin SMP7 gespottet.

Für die Bestimmung des dynamischen Bereichs werden die Konzentrationen $1x10^{-7}$ M, $1x10^{-10}$ M, Null, $1x10^{-10}$ M, $1x10^{-8}$ M, Null M, $1x10^{-8}$, $1x10^{-7}$ M, $1x10^{-9}$ M und Null M im Qarray mini von Genetix mit dem Stealth Pin SMP7 spaltenweise in 8 Reihen Replika gespottet. Somit entsteht ein 10x8 Array mit stark unterschiedlichen Signal-Intensitäten, die benachbart zueinander liegen. Die Chips werden, wie in Kapitel 7.5 beschrieben, gereinigt und können nun in den Mikroarray-Readern ausgelesen werden. Immun-Tests finden nicht auf dieser Oberfläche statt. Antikörper sind nicht aminoreaktiv und müssten für eine kovalente Anbindung zusätzlich modifiziert werden. Dieser Test dient der Charakterisierung der optischen Optik-Einheit.

7.4 Spotting

Zum Aufbringen der Mikrospots wird der Qarray mini, Fa. Genetix, New Milton, England verwendet. Die verwendeten Substanzen werden in gewünschter Konzentration mit 35-40µL Volumen in eine 384 Mikrotiterplatte pipettiert und mit dem Solid Pin (Genetix, 150 µm Durchmesser Nadelspitze) gespottet. Die abgegebene Menge beträgt pro Spot ca. 1 nL, welche einen Durchmesser von ca. 150 µm aufweisen. Weitere Parameter der Routine sind:

Stamps per Inking:	1
Stamp Time [ms]:	1
Stamps per Spot:	1
Inking Time [ms]:	200
Humidity [%]:	65
Pitch [µm]:	500

Des Weiteren werden die Nadeln einmal wöchentlich mit aQu Clean (Genetix, New Milton, UK) zu 2 % (v/v) in destilliertem Wasser gelöst und für 10 min im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend wird die Nadel weitere fünf Minuten in destilliertem Wasser im Ultraschallbad gereinigt, um Reste des Reinigungsmittels zu entfernen. Nun wird die Nadel mit Isopropanol vor dem Einsetzen in dem Spotter abgespült und an der Luft getrocknet. Das aQu Clean dient der Entfernung von Proteinresten auf der Nadel. Im Spotter befindet sich eine zusätzliche Waschstation, die innerhalb der Routine die Nadel reinigt. So kann der Spotter mit Ethanol, destilliertem Wasser oder Stickstoff die Nadel mit den folgenden Einstellungen spülen:

Substanz	Waschdauer [ms]	Trockenzeit [ms]	Wartezeit [ms]
destilliertes Wasser	5000	0	500
Ethanol	5000	5000	5000
destilliertes Wasser	5000	0	500
Ethanol	5000	7000	5000

Die gezeigte Waschkaskade wird jeweils nach ca. 150 abgesetzten Spots angewandt. Die Lagerung von bespotteten Chips erfolgt bei 6 °C im Kühlschrank, die Chips sollten mind. zwei Tage vor Gebrauch lagern und sind mind. 3 Monate haltbar. Die jeweilig gespotteten Konzentrationen für die verschiedenen Versuche sind den speziellen Kapiteln im Ergebnisteil zu entnehmen.

Auch andere Spotter werden zum Aufbringen der Mikroarrays verwendet, die bei den Tests zugeordnet sind. So wurde der TopSpot, Fa. Biofluidix, Freiburg von Dr. Peter Koltay zur Verfügung gestellt. Auch der BioOdyssey Calligrapher Miniarrayer, Fa. Bio-Rad, München wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Günter Gauglitz vom Institut für Physikalische und Theoretische Chemie zum Aufbringen der Arrays verwendet. Als

Spottingpuffer dient der 0,001 % Natriumdeoxycholat (Sigma-Aldrich, München) in 1x PBS (Invitrogen, Karlsruhe).

7.5 Blocken

Bevor die Biochips im POCT-System weiter verarbeitet werden, muss die Oberfläche geblockt werden. Dabei wird eine Lösung PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20 auf das Mikroarray pipettiert und für 30 Minuten auf einem Kühlakku in einer Thermobox inkubiert. Zum einen besetzen die Tenside die freien Bindungsstellen der Epoxidgruppen. Das verhindert, dass die zugeführten Proteine während des Tests nicht die freie Oberfläche besetzen und so ungewollt das Signal des Hintergrunds erhöhen, was das Signal-Rausch-Verhältnis verschlechtern würde. Zum anderen werden nicht gebundene Proteine der Mikrospots abgelöst. Nicht angebundene Proteine von Mikrospots führen zu weniger reproduzierbaren Signalen. Der Chip wird kurz mit PBS abgespült, um überschüssige Tenside abzuwaschen und wird anschließend im Stickstoffstrom getrocknet. Der Chip sollte nach dem Blocken nach spätestens einem Tag, vorzugsweise direkt, weiter prozessiert werden.

8 Biochip-System WLS

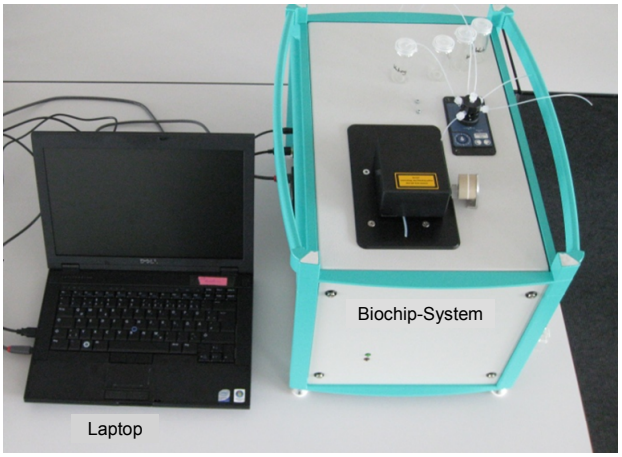


Abb. 23 Biochip-System WLS

Das WLS ist ein Tischgerät, welches aus einer Fluidik- und einer Optik-Einheit besteht. Die Steuerung erfolgt über einen Laptop.

Das Biochip-System WLS in Abb. 23 ist eine Kombination aus einer Optik-Einheit für Mikroarrays mit Wellenleiterchips und einer Fluidik-Einheit. Das Gesamt-System kann somit Signale von Mikroarrays erfassen und die Immun-Tests prozessieren. Im System befindet sich ein Laser der nach Durchlaufen mehrerer optischer Komponenten in das optische Gitter des Wellenleiterchips eingekoppelt wird. Das so entstehende evaneszente Feld regt nun die oberflächennahen Farbstoffe durch Total Internal Reflection Fluorescence an (siehe Kapitel 4.2). Das emittierte Licht wird im Interferenzfilter von der Anregungswellenlänge des Lasers getrennt und von einer CCD-Kamera aufgenommen. Die fluidischen Komponenten sind für die Signalentstehung der Immun-Tests verantwortlich. Durch die in das System integrierte Spritzenpumpe, verschiedene Ventile, Schläuche, Blasenfalle und einer Flusszelle können ohne manuelle Schritte die Tests vollzogen werden. Durch Implementierung der

steuerbaren Komponenten in eine Software, die über einen Laptop bedient wird, kann die komplette Durchführung der Immun-Tests und die Signalaufnahme auf Basis von Mikroarrays vollautomatisch prozessiert und ausgewertet werden, siehe Kapitel 14 „Automatisierung des Messvorgangs“.

8.1 Optik-Einheit

8.1.1 Komponenten

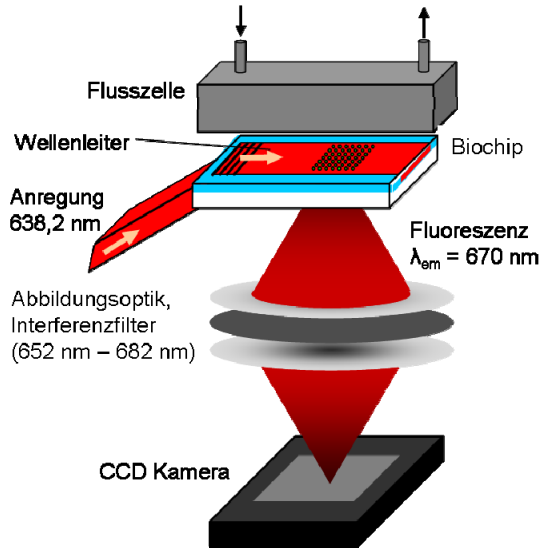


Abb. 24 Schema Optik-Einheit

Nach Einkoppeln der Anregungsquelle in den Biochip wird die Fluoreszenz mit Hilfe der Abbildungsoptik mit der CCD-Kamera detektiert, der Interferenzfilter trennt die Anregung und Fluoreszenz durch Reflektion ab.

Im Folgenden werden die Komponenten der Optik-Einheit, welche in Abb. 24 schematisch dargestellt sind, erklärt.

Laser:
Der thermoelektrisch gekühlte Diodenlaser hat eine Wellenlänge von 638,2 nm mit einer Betriebstemperatur zwischen -20 °C bis 40 °C. Die Ausgangsleistung beträgt 5 mW. Die Linienoptik formt eine 2 cm lange und ca. 1 mm breite homogene Linie. Die Ausgangsleistung des Lasers ist steuerbar. Das System ist augensicher, da die Leistung an der Strahlaustrittsöffnung unter 1 mW liegt. Ein magnetischer Schalter unterbricht den Laser zusätzlich beim Öffnen des Deckels. Der Laser trifft mit TE-polarisiertem Licht auf das Gitter.

Drehbarer Umlenkspiegel:
Ein drehbarer Umlenkspiegel ist über ein Goniometer so konstruiert, dass sich der Drehpunkt des Lasers direkt auf dem optischen Gitter des Wellenleiterchips befindet. Das Goniometer kann über einen Schrittmotor sehr exakt gesteuert werden, somit ist der Einkoppelwinkel des Lasers sehr fein und automatisch justierbar und der Drehpunkt der Laser-Linie genau auf dem optischen Gitter des Wellenleiterchips.

Objektiv:
Das Tandem-Objektiv hat eine numerische Apertur von 0,48 und einen Vergrößerungsfaktor von 0,8. Es ist speziell für die Abbildung des Mikroarrays auf der CCD-Kamera ausgelegt. Nach Gleichung 20 (S. 30) ergibt sich somit für dieses Objektiv ein Öffnungswinkel von $\alpha = 28{,}7\,°$ in $n_{Luft} = 1$ als Medium.

Interferenzfilter:
Der Bandpassfilter reflektiert das Anregungslicht des Lasers und ist für die Wellenlänge des Farbstoffs durchlässig. Der durchlässige Bereich ist von 652 – 682 nm. Die maximale Intensität von Farbstoffen wie Alexa 647 oder DY 647 liegt bei 672 nm. Der Filter befindet sich im parallelen Strahlengang des Tandem-Objektivs, wo optimale Filterbedingungen vorliegen. Der Filter kann durch einen automatischen Filterschieber gewechselt werden. Eine Position ist frei, um den optimalen Einkoppelwinkel mit dem „Drehbaren Umlenkspiegel“ zu ermitteln. Eine Filterposition ist mit dem Standardfilter HQ 667/30 besetzt. Die zweite Filterposition ist frei verwendbar. In der Arbeit ist zur Untersuchung von Farbstoffen an dieser Stelle der Filter 720/30, durchlässig zwischen 705 -735 nm, oder ein Langpassfilter ab 785 nm eingesetzt.

CCD-Kamera:
Die kostengünstige Firewire Kamera ist für den nahinfraroten Bereich mit höherer Quanteneffizienz optimiert. Diese ist doppelt so hoch wie bei nicht optimierten CCD-Chips. Die Pixelgröße beträgt 8,4x9,8 µm bei 768x492 Pixel und hat eine Auflösung von 8 bit. Die maximale Integrationszeit beträgt 67,1 Sekunden. Zu Beginn der Arbeit befand sich eine andere monochromatische 8-bit Kamera im Gerät, die Daten aus Kapitel 12 „Charakterisierung der Optik-Einheit“ basieren auf dieser Kamera. Tests der zwei Kameras haben aber gezeigt, dass die Charakteristika wie z. B. Sensitivität vergleichbar sind und somit auch die Ergebnisse dieser Versuche für die neue Kamera gültig sind.

8.1.2 Dynamischer Bereich der CCD-Kamera

Für ein System für patientennahe Diagnostik ist es notwendig, die Kosten der Komponenten niedrig zu halten. Eine wichtige Kostenposition hierbei ist die CCD-Kamera. Deswegen wird über eine spezielle Methode eine kostengünstige 8-bit Firewire Kamera eingesetzt. Da der Signal-Bereich des Systems eine Dynamik über 3-4 Dekaden erreichen soll, ist eine Methode entwickelt worden, die den dynamischen Bereich von 8-bit mit maximal 2,4 Dekaden ausbaut. Die Integrationszeit der Kamera kann dazu beitragen, den dynamischen Bereich zu erhöhen. Bei der verwendeten Kamera konnte über einen nutzbaren Bereich von 0,01-60 Sekunden eine proportionale Zunahme des Signals mit der Integrationszeit nachgewiesen werden. Zur Erklärung: Ein Signal mit dem Grauwert 50 bei einer Sekunde Integrationszeit der Kamera entspricht einem Signal mit Grauwert 100 bei zwei Sekunden Integrationszeit. So kann der dynamische Bereich auf 3,77 Dekaden bei 0,01-60 Sekunden ausgebaut werden.

Gleichung 27 Normierung der Intensität der Integrationszeit

$$N(X) = \frac{s \cdot REF_{Zeit}}{INT_{Zeit}}$$

N(X)= Normiertes Nutzsignal eines Spots
s = Nutzsignal
INT_{Zeit} = Effektive Integrationszeit der Aufnahme [s]
REF_{Zeit} = Norm-Wert [10 s]

Für die Aufnahme eines Mikroarrays wird dasselbe Array mit verschiedenen Integrationszeiten aufgenommen, wie in Kapitel 14 „Automatisierung des Messvorgangs“ beschrieben. So wird z. B. ein Array mit der minimalen Integrationszeit von 0,04 Sekunden als erstes Bild aufgenommen. Bei den fünf folgenden Bildern wird jeweils die Integrationszeit um den Faktor drei erhöht. Für die Auswertung der Mikroarrays mit dem Analyseprogramm wird für jeden einzelnen Spot die optimale Integrationszeit bestimmt. Diese ist erreicht, wenn das Signal zwischen den Grauwerten 100-200 liegt. Für sehr niedrige Signale wird jedoch die maximale Integrationszeit verwendet. Um aus dem Bilderstapel die Rohdaten zu extrahieren, werden die Daten vorher mit Gleichung 27 normiert. Die Referenzzeit REF_{Zeit} ist ein über alle Messungen hinweg konstanter Faktor, der im System auf 10 Sekunden festgelegt ist. Somit wird das Nutzsignal eines Mikrospots, das nach Kapitel 12.3 „Bestimmung der Mikrospot-Intensität“ berechnet und mit der Integrationszeit INT_{Zeit} aufgenommen wird, auf 10 Sekunden zu N(X) normiert. Also hat ein Mikrospot, der das Nutzsignal 100 besitzt und mit einer Sekunde Integrationszeit aufgenommen ist, den normierten Wert N(X) = 1000.

8.2 Fluidik-Einheit

Pumpe:
Die Pumpe ist eine PSD/2 Modul der Firma Hamilton, Bonaduz, Schweiz. Das Spritzenvolumen beträgt 250 µl und hat eine einstellbare Geschwindigkeit von 1-60 Sekunden pro Vollhub. Das Spritzenmaterial besteht aus Borosilikatglas mit einem Kolben aus Teflon. Auf dem Spritzenaufsatz befindet sich ein Y-Ventil und macht so Ein- und Ausgang frei einstellbar. Die Steuerung erfolgt über RS-232. Spritzenpumpen sind generell sehr präzise, dieses Modell hat eine Präzision bei der Dosierung der Volumina von 0,3 %.

Verteilerventil:
Der Modular Valve Positioner der Firma Hamilton, Bonaduz, Schweiz hat einen Hauptport, der mit acht unterschiedlichen Nebenports einzeln wählbar verbunden werden kann. Anschlüsse und Ventil sind chemisch inert. Die Steuerung erfolgt über RS-232.

Blasenfalle:
Hersteller ist die Firma Omnifit, auch über msscientific, Berlin (Nr. 006BT/M) erhältlich. Der Körper aus Polyetheretherketon (PEEK) umschließt eine luftdurchlässige, hydrophobe Membran. Luftblasen werden durch die Membran entfernt, Fluide bleiben im Kanal, dadurch wird Luft ausgefiltert.

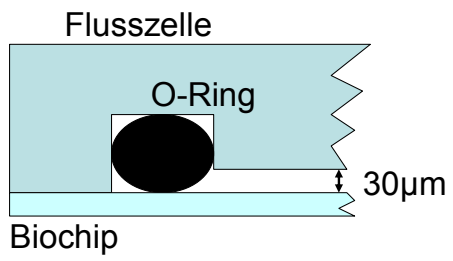


Abb. 25 Flusszelle

Ein O-Ring wird in der Nut der Flusszelle auf dem Biochip verpresst, so beträgt die Spaltbreite 30 µm.

Flusszelle:
Die Flusszelle ist aus schwarzem Polyoxymethylen (POM) gefertigt. Sie hat ein Fassungsvermögen von 3 µl mit Passung für einen 1 mm dicken O-Ring aus Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk (EPDM), C. Otto Gehrckens, Pinneberg. Der O-Ring wird bei ausreichendem Anpressdruck komplett in der Nut verpresst, wie in Abb. 25 dargestellt. Der innere Teil der Zelle, welcher die Kammer bildet, schafft so eine Zellhöhe von 30 µm.

9 Messaufbauten

9.1 Abstrahlcharakteristik

Zur Aufnahme der winkelabhängigen Abstrahlung oberflächennaher Fluorochrome wird ein spezieller Messplatz aufgebaut, der in Abb. 26 gezeigt ist.

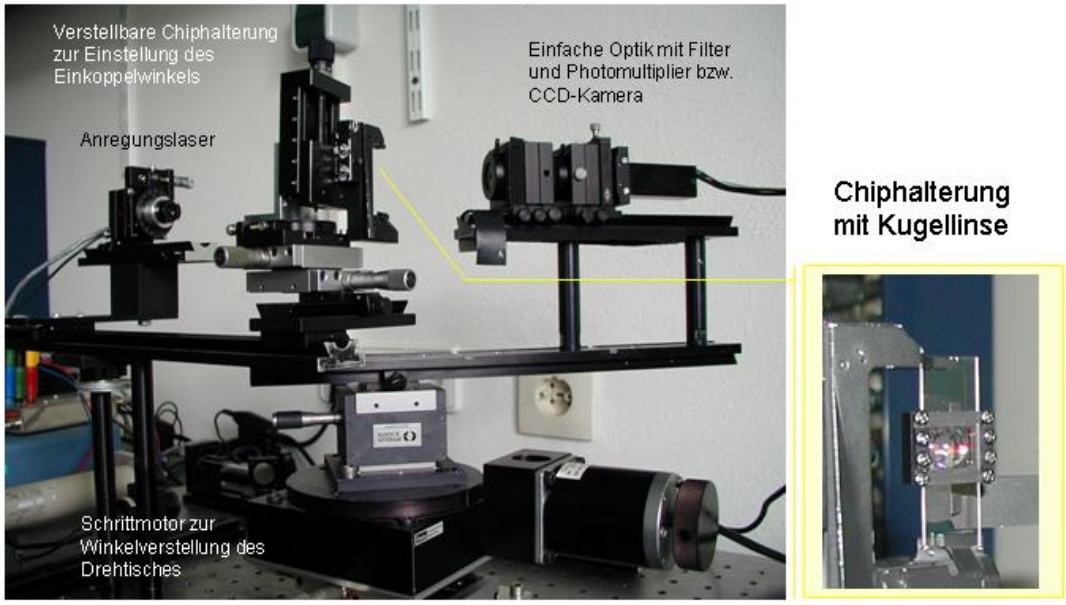


Abb. 26 Messaufbau der winkelabhängigen Abstrahlung oberflächennaher Fluorochrome

Ein Laser und ein Wellenleiterchip sind stationär gehaltert. Der Chip wird abstandneutral von einem Photomultiplier als Detektor um ± 75 ° abgerastert. Auf dem Chip ist eine Halbkugellinse mit Immersionsöl aufgebracht, so wird die Fluoreszenz brechungsfrei aus der Rückseite des Chips gekoppelt.

Ein Laser mit Linienoptik koppelt in einen Wellenleiterchip ein. Auf diesem ist eine Halbkugellinse mit Immersionsöl aufgebracht, die es erlaubt die entstehende Fluoreszenz ohne Brechung aus dem Chip auszukoppeln. Auf den Chip wird mit Alexa 647 markiertes Streptavidin mit 1 g/l gegeben, welches nach Anregung fluoresziert. Der

Detektor, welcher den Winkel abrastert, ist auf einem Schrittmotor befestigt. Vor dem Detektor befindet sich ein plankonvexes Linsenpaar (f = 100 mm und f = 25 mm), das die Fluoreszenz auf den Detektor abbildet. Zwischen dem Linsenpaar befindet sich der Interferenzfilter HQ 700/75 von AHF Analysentechnik, Tübingen. Die Einstellung der Fokusse wird mit einer CCD-Kamera vorgenommen. Der Fokus ist auf den Wellenleiterchip mittig zur Halbkugellinse in der Ebene des Farbstoffs gelegt. Diese Einstellung wird bildverarbeitungstechnisch abstandsneutral justiert. Zur Abrasterung der Winkelverteilung fährt der Photomultiplier als Detektor in 2 °- Schritten ganze ± 75 ° um den Biochip. So kann das emittierte Licht winkelabhängig abgetastet werden. Die Fokusse des Linsenpaars und zusätzliche Blenden gewährleisten, dass die Intensität des aufgenommenen Winkelbereichs je Position sehr klein ist.

9.2 Dosierung und Multilamination

Der Messaufbau zur Erfassung der Messdaten von Kapitel 13.1 „Multilamination und Dosierung“ und 13.2 „Mischen durch Taylor-Dispersion“ wird mit einem Laser, einer Abbildungsoptik und einer CCD-Kamera realisiert, siehe Schema in Abb. 27. Nach der substanzspezifischen Absorption von Licht wird die transmittierte Intensität über die CCD-Kamera aufgenommen. Die Substanzen werden im Schlauch (Material: FEP, 0,8 mm Durchmesser) an der Kamera vorbei transportiert. Die Aufnahmefrequenz der Kamera beträgt 30 ms und das Fördervolumen der Spritzenpumpe 8,3 µl/s.

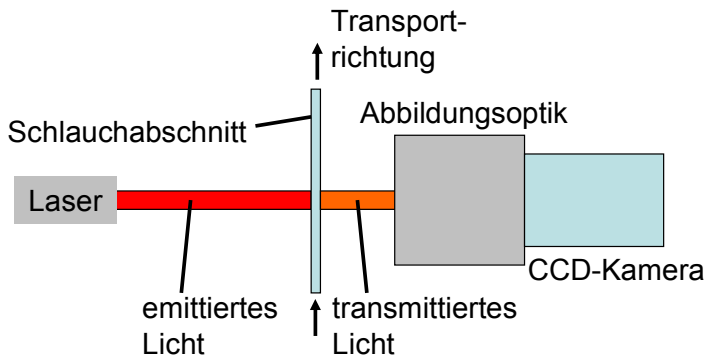


Abb. 27 Aufbau zur Messung der Dosierung und Multilamination

Ein Laser mit Linienoptik leuchtet den Teil eines Schlauchsegments aus, in dem die verschiedenen Substanzen transportiert werden. Auf der Gegenseite befindet sich eine Abbildungsoptik mit CCD-Kamera, diese nimmt zeitaufgelöst die Intensität des transmittierten Lichts auf. Das Signal ist somit von der Absorptionsfähigkeit der Substanz abhängig.

IV Ergebnisse und Diskussion

10 Untersuchung der Abstrahlcharakteristik

Im theoretischen Teil 4.3 wurde auf die „Abstrahlcharakteristik oberflächennaher Fluorochrome“ eingegangen. In diesem Kapitel soll die Abstrahlung eines fluoreszierenden Spots mit den Welleiterchips erläutert werden. Das Ergebnis wird auf die Signalaufnahme mit dem WLS übertragen, um die detektierbare Leistung zu ermitteln. Der Messaufbau zur Aufnahme der Abstrahlcharakteristik ist in Kapitel 9.1 beschrieben. In Abb. 28 a) wird die emittierte Fluoreszenz über eine Halbkugellinse, die mit Brechungsindexöl auf der Rückseite des Wellenleiterchips befestigt ist, annähernd brechungsfrei aus dem Chip geleitet. Somit wird die Abstrahlcharakteristik des Fluorchroms direkt vom Detektor, der den Chip mit von -75 °bis +75 ° im Inkrement von 2 ° abrastert aufgenommen. D. h. auch die Fluoreszenzanteile, die sonst, wie im theoretischen Teil 4.3 beschrieben, durch Totalreflektion im Chip verbleiben, können nun detektiert werden. Auf der Rückseite des Chips befindet sich im Aufbau des WLS die Detektion. In Abb. 28 b) wird die Vorderseite des Chips im Medium Luft direkt abgerastert. Hierbei wird keine Halbkugellinse benötigt, da sich keine weiteren Grenzflächen zwischen Fluoreszenzemission und Detektor befinden.

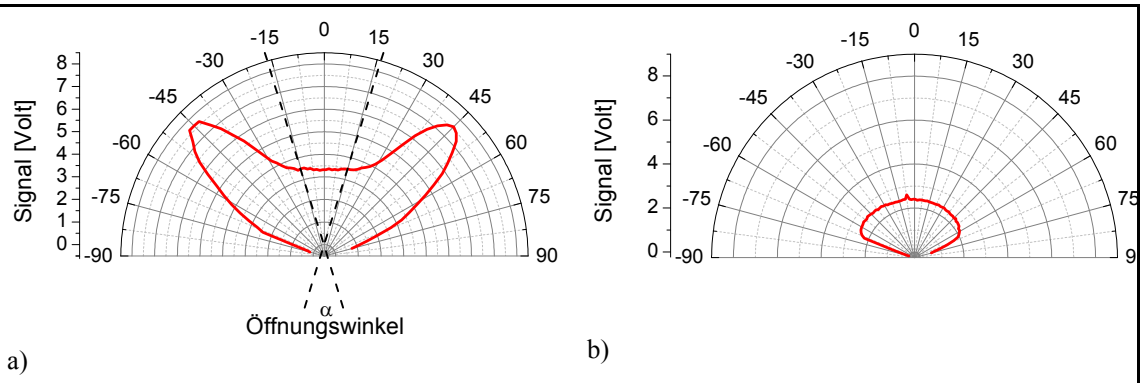


Abb. 28 Abstrahlcharakteristik von oberflächennah angebundenen Fluorochromen

a) Fluoreszenz über die Rückseite des Biochips mit Halbkugellinse ausgekoppelt

b) Fluoreszenz über die Vorderseite des Biochips im Medium Luft direkt aufgenommen

Die x-Achse des Polarkoordinatendiagramms zeigt die Winkelposition des Photomultipliers und die y-Achse dessen aufgenommenes Signal in Volt.

In Abb. 28 a) ist das Ergebnis drei gemittelter Replikatsmessungen der Abstrahlcharakteristik der Chiprückseite mit Halbkugellinse zu sehen. Hierbei ist zu beachten, dass diese Abstrahlcharakteristik rotationssymmetrisch ist. Die Hauptmaxima der Winkelverteilung liegen bei ca. ± 45 °. Wie zuvor berechnet, liegt der kritische Winkel zwischen Glassubstrat (n_S = 1,518) und Luft (n_{Luft} = 1) bei θ_k = 45,7 °. Somit ist eine

Korrelation der Messung im Aufbau mit den theoretischen Berechnungen aus [46] gezeigt, die Maxima der anisotropen Abstrahlung liegen im Bereich des kritischen Winkels. Hierbei ist zu beachten, dass durch die zusätzliche Wellenleiterschicht des Wellenleiterchips die Abstrahlcharakteristik nicht komplett identisch zu [46] ist und die benannte Korrelation rein qualitativ zu verstehen ist. In Abb. 28 b) sind drei Replikatsmessungen der Abstrahlcharakteristik der Chipvorderseite dargestellt. Zu sehen ist eine annähernd homogene Abstrahlung zwischen ± 75 °. Auch diese Abstrahlcharakteristik stimmt qualitativ mit den theoretischen Berechnungen überein. Da diese Seite des Chips der Position der Flusszelle entspricht, soll hier im Weiteren das Detektionsprinzip des WLS auf der Rückseite, also mit Abb. 28 a) noch genauer betrachtet werden. Das verwendete Objektiv des WLS besitzt eine numerische Apertur von N.A. = 0,48, daraus ergibt sich ein Öffnungswinkel nach Gleichung 20 von ± α = 28,7 °. Da die die Lichtstrahlen ohne Halbkugellinse vom Lot weggebrochen werden, liegt der maximale Winkel, der den Chip verlassen kann nach Gleichung 7 (auf S. 18) bei θ_2 = 15,8 °. Da die Abstrahlcharakteristik rotationssymmetrisch ist, wird die Messung an einen polynomiellen Fit neunter Ordnung zwischen 0 - 75 ° angepasst, um die Leistung zu berechnen. Durch Rotation um die y-Achse dieser Fitfunktion erhält man folgenden Zusammenhang:

Gleichung 28 Volumen der Abstrahlcharakteristik

$$P = 2\pi \int_u^o \left(\theta \cdot f(\theta)\right) d\theta$$

mit

$$f(\theta) = a_0 + a_1 \cdot \theta + a_2 \cdot \theta^2 \ldots\ a_9 \cdot \theta^9$$

P = Leistung der Fluoreszenzemission
θ = Winkel und Abstrahlrichtung [°]
o = Obere Grenze [°]
u = Untere Grenze [°]
Polynomieller Fit 9. Ordnung f(x); Parameter:

a0	2,99115
a1	0,4074
a2	-0,13324
a3	0,01887
a4	-0,00137
a5	$5{,}59 \times 10^{-5}$
a6	$-1{,}32 \times 10^{-6}$
a7	$1{,}78 \times 10^{-8}$
a8	$-1{,}28 \times 10^{-10}$
a9	$3{,}81 \times 10^{-13}$

Somit ergibt sich nach Gleichung 28 ein prozentualer Unterschied der Leistung mit unterer Grenze u_1 = 0 ° und oberer Grenze o_1 = 75 ° und mit unterer Grenze u_2 = 0 ° und oberer Grenze o_2 = 15,8 ° von 0,7 %. Somit kann die Kamera maximal 0,7 % der abgestrahlten Intensität detektieren, die Verluste werden durch Totalreflektion, Brechung und den Öffnungswinkel des Objektivs verursacht. Selbstverständlich werden an ande-

rer Stelle noch Verluste durch die Transmission am Interferenzfilter und an weiteren optischen Elementen verursacht, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll. Durch Verwendung einer Halbkugellinse oder ähnlichen diffraktiven Elementen könnte jedoch die Sensitivität erheblich gesteigert werden, wie auch in [46] beschrieben ist. Hier erbrachten die diffraktiven Elemente eine Steigerung von über Faktor 25 an Intensitätsgewinn. Die in diesem Absatz gezeigten Berechnungen ergeben einen Signalgewinn von ca. Faktor 24. Die benötigten Maßnahmen für eine Umsetzung dieser Anwendung gehen jedoch mit einem erheblichen Verlust nutzbarer Sensorfläche einher, so beträgt die Sensorfläche für einen Spot ca. 4,3 x 4,3 mm [82], auf derselben Fläche können mit dem WLS mit 500 µm Abstand pro Spot 64 Spots untergebracht werden. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Aktivitäten in diese Richtung verfolgt. Ein weiterer wichtiger Grund hierfür ist, dass die TIRF-Technologie bereits eine sehr effektive Anregung mit sich bringt (siehe Kapitel 12.1 „Nachweisgrenze“).

11 Herstellung von Biochips

Im Laufe dieser Arbeit wurden insgesamt 1896 Chips für die Untersuchung und Charakterisierung der Optik-Einheit, der Fluidik-Einheit und der Immun-Tests verwendet. Hierbei wurden diverse Maßnahmen zur Verbesserung der Qualität der Biochips bei der Herstellung umgesetzt, die in diesem Kapitel festgehalten und erklärt werden sollen. Die praktische Durchführung des Prozesses ist in Kapitel 7 des experimentellen Teiles „Herstellung von Biochips“ formuliert.

11.1 Reinigung und Epoxid-Schicht

Für die Qualität des Biochips ist die aufzubringende Epoxid-Schicht das Fundament für alle folgenden Prozessschritte. Aus diesem Grund spielt die zuvor durchgeführte Reinigung der Wellenleiterchips eine wichtige Rolle. Die im Kapitel 7.1 beschriebene Reinigungskaskade wurde nach intensiver Untersuchung des Einflusses auf die Homogenität und Dämpfung des Wellenleiterchips erstellt. Eine wichtige Erkenntnis hierbei ist, dass eine Sauerstoffaktivierung der Oberfläche oder die Behandlung mit reinraumtypischen Lösungsmitteln wie z. B. Aceton, Propanol oder Ethanol als Reinigungsmittel die Inhomogenität und vor allem die Dämpfung im Mittel im Chip um ca. 1,5 dB erhöht. Daher ist die optimale Reinigungskaskade ausschließlich aus Hellmanex und diH_2O zur Reinigung aufgebaut, die verbessert die Dämpfung der Chips sogar im Mittel im Chip um ca. 1,2 dB. Somit konnte eine effiziente Reinigung sichergestellt werden.

Das anschließende Beschichten der Wellenleiterchips mit Epoxid muss wiederum hohe Anforderungen erfüllen. Die Schicht muss homogen, optisch hochwertig und chemisch funktionell sein, um die Basis für ein hochwertiges Mikroarray zu gewährleisten. Schwankungen der Schichtdicken des Epoxids beeinflussen die Intensität des evaneszenten Felds. Aus diesem Grund wurden die Schichtdicken untersucht. Hierzu wird mit

dem Profilometer „Dektak“ eine Abrisskante der Epoxid-Harz-Schicht abgefahren. Um exakte Abrisskanten zu erzeugen, kann mit einem kleinen Stift, der in Butanon getränkt ist, die Schicht wieder vom Chip abgelöst werden. So kann das Profilometer von der Oberfläche des Wellenleiterchips auf die Epoxid-Harz-Schicht fahren um die Schichtdicke in Tabelle 5 zu bestimmen.

Tabelle 5 Schichtdicke der Epoxid-Harz-Schicht [83]

Chip Nr.	Schichtdicke [nm]
1	9
2	< 9
3	< 9
4	11
5	9
6	< 9

Versuche die Schichtdicke mit einem Ellipsometer oder einem 3-d Laserscanning Mikroskop aufzunehmen, scheiterten am Detektionslimit der Systeme. Grund hierfür ist die dünne Schicht in Verbindung mit dem niedrigeren Brechungsindex. Am Ellipsometer konnte mit dickeren Schichten der Brechungsindex von 1,571 gemessen werden. Unter diesen Randbedingungen stellt das Profilometer die am besten geeignete und zugängliche Messmethode dar, jedoch befinden sich die gemessenen Schichtdicken auch hier nahe am Detektionslimit. Der Fehler des Profilometers ist mit ± 2 nm angegeben. Dabei ergibt sich aus den Messungen eine mittlere Schichtdicke von ca. 9 nm ± 2 nm.

Eine chemische Überprüfung der Funktionalität der Schicht konnte durch die Messung des Kontaktwinkels durchgeführt werden. In der Literatur [84] ist der Kontaktwinkel von Wasser auf einer Epoxid-Harz-Schicht (mit Sessile drop Methode) mit einer Schichtdicke von 6,8 nm mit ca. 65 ° angeben, bei 10 nm mit ca. 67 °. Dies kommt durch den Einfluss der Schichtdicke auf den Kontaktwinkel zustande, welcher bei niedrigen Schichten unterhalb von ca. 10 nm abnimmt. Über 10 nm Schichtdicke bleibt der Kontaktwinkel konstant. Eigene Messungen mit der Sessile drop Methode mit Epoxid-Schichten auf den Wellenleiterchips zeigten einen mittleren Kontaktwinkel von 65 ° ± 2 ° bei n = 6 Chips. Somit liegt der Kontaktwinkel in einem vergleichbaren Bereich und die Funktionalität der Schicht ist gegeben.

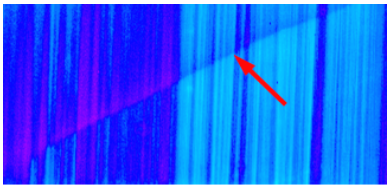


Abb. 29 Beschichtungsfehler
Der rote Pfeil markiert eine Kante im Chip, die Zeichen für einen deutlichen Unterschied in der Höhe der Epoxid-Schicht ist.

Jedoch konnten auch Fehler in der Prozessierung festgehalten werden, wie in Abb. 29 zu sehen ist. Ein starker Höhenunterschied der Epoxid-Schicht verursacht eine stark inhomogene Anregung. In diesem Fall ist der Halter der Chips beim Aufbringen der Schicht durch Tauchbeschichten in das Lösungsmittel eingetaucht. Somit kann das Lösungsmittel mit dem gelösten Epoxid inhomogen ablaufen und verursacht solche starken Beschichtungsfehler. Da solche Chips aber

sehr schnell augenscheinlich und im Gerät zu erkennen sind, können solche Chips direkt verworfen werden.

Zusammengefasst konnten durch die Optimierung der Reinigungsroutine die Eigenschaften des Wellenleitchips in Bezug auf Homogenität und Dämpfung der Lichtausbreitung verbessert werden. Die Reinigung bietet eine gute Grundlage für das anschließende Beschichten mit Epoxid. Festzuhalten ist, dass sich Epoxid-Schichten bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 20 % unter einer ruhenden Stickstoffatmosphäre am besten aufbringen lassen. Hierbei werden die Schichten besonders klar und homogen. Untersuchungen der Dicke der Epoxid-Schichten zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit auf, auch die Untersuchungen der Kontaktwinkel lassen auf konstante chemische Eigenschaften schließen.

11.2 Spotting

Im Verlauf dieser Arbeit wurden unterschiedliche Spotter für die Durchführung von Immun-Tests verwendet. Da vor allem im späteren Verlauf der Arbeit die gesamte Prozessierung der Biochips selbständig mit dem Spotter Qarray mini durchgeführt wurde, wurde hier der Prozess untersucht und optimiert.

Um den Ablauf des Spottings getrennt vom WLS und den selbst hergestellten Wellenleiterchips zu untersuchen, werden mit Epoxid funktionalisierte Standard-Objektträger verwendet, die in einem kommerziellen Fluoreszenzreader ausgelesen werden. Dabei werden mit Fluoreszenz markierte IgG-Antikörper direkt auf dem Objektträger immobilisiert. Aus diesem Grund ist nur der Fehler des Spottings enthalten, keine optischen Fehler bezogen auf Wellenleiterchips oder des WLS. In Abb. 30 a) bis c) sind Ausschnitte eines 10x10 Arrays zu sehen, bei dem die Einstellung des Nadelhubs, definiert in Abb. 30 d), im Spotter zwischen 0,5 - 1 - 2 mm variiert wird.

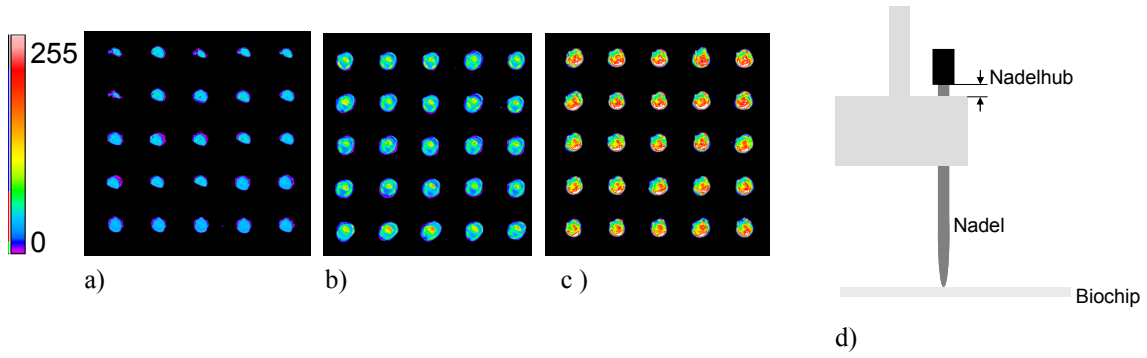


Abb. 30 Fehler Spotting durch Nadelhöhe
a) Mikroarray mit Nadelhub ca. 0,5 mm
b) Mikroarray mit Nadelhub ca. 1 mm
c) Mikroarray mit Nadelhub ca. 2 mm
d) Mikroarray mit Definition des Nadelhubs

Deutliche Unterschiede der Arrays sind ersichtlich. Der Einfluss des Nadelhubs ist hoch. In a) beträgt der Variationskoeffizient Spot-zu-Spot 55 %, in b) nur 6% und in c) 16 %. Sowohl in a) als auch in c) ist ein Verlauf von Spot-zu-Spot zu beobachten. Dies konnte auch in weiteren Versuchen wiederholt gezeigt werden. In a) werden die Spots zunehmend kleiner, was hohe Varianzen in der Intensität verursacht. In c) werden die Spots zunehmend heller. Insgesamt steigt der Mittelwert des Arrays von a) nach c) von 2,8 auf 6,5 und 13 an. Der Unterschied der mittleren Intensität ist somit stark ausgeprägt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass je stärker der Nadelhub, desto länger beträgt der Kontakt der Nadel und umso größer wird die Abgabemenge der Spottingsubstanz. Zwar wird mit einer Kontaktzeit des Verfahrens mit 0,5 s diesem Effekt entgegengewirkt, dennoch ist er noch stark ausgeprägt. Der Effekt des Intensitätsverlaufs von Spot-zu-Spot erklärt sich durch eine Anreicherung bzw. Verarmung der Spottingsubstanz auf der Nadel. Also sind über mehrere Spots hinweg gesehen aufgenommene und abgegebene Mengen nicht konstant. Insgesamt erbrachte der Nadelhub wie in b) mit nur 6 % Variation die am meisten reproduzierbaren Resultate und wird daher als Optimum für die Herstellung der Biochips übernommen. Zusammengefasst ist der Nadelhub eine Fehlerquelle, die sich von Spot-zu-Spot durch Einlaufverhalten fortpflanzen kann, sowohl zunehmend als auch abnehmend in der Intensität und auch variierende Spot-Morphologien werden verursacht. Somit können an dieser Stelle immense Fehler verursacht werden. Die Einstellung der Nadelhöhe wird durch geeignete Messmethoden vor der Chipproduktion überprüft.

Die Untersuchung der Reinigung der Nadel inner- und außerhalb des Spotters mit aQu Clean, diH_2O, Ethanol (siehe Kapitel 7.4 „Spotting“) etc. zeigte Folgendes auf: Erstens werden die Nadeln einmal wöchentlich mit aQu clean gereinigt. Nur dieses Reinigungsmittel war in der Lage Proteinreste vollständig von der Nadel zu lösen, bei anderen Reinigungsmitteln muss mit Verschleppung der Substanzen gerechnet werden. Dies ist beim Wechsel der zu spottenden Reagenz eine Fehlerquelle. Aus diesem Grund besitzt jede Substanz eine spezielle Nadel, um Verschleppungen unmöglich zu machen. Des Weiteren wird wie beschrieben die interne Waschroutine des Spotters nach der Abgabe von ca. 150 Spotreplikaten aktiviert. Diese verhindert eine Anreichung der zu spottenden Reagenz an der Nadel. Ohne diese Waschroutine verändern sich Abgabemenge und somit Spotmorphologie und -signal, was zu Varianzen führen kann. Als letzte Maßnahme zur Optimierung des Spottingprozesses sollten unbedingt konstante Umgebungsbedingungen geschaffen sein. Der Einfluss von Temperatur, Luftfeuchtigkeit etc. beeinflusst die Spots. Aus diesem Grund wurde der Spotter im Reinraum platziert. Diese Maßnahme erhöht die Qualität und die Stabilität der Arrays.

12 Charakterisierung der Optik-Einheit

In diesem Kapitel werden die Optik-Einheit und die dazugehörige Analyse der Mikrospots durch das System charakterisiert. Die Charakterisierung soll die Tauglichkeit der Einheit mit Hinblick auf den Einsatz mit Mikroarrays für die Diagnose von Sepsis prüfen. Ein wichtiges Glied in der Kette stellt die Signalanalyse der Messung der Mikroarrays dar. Hier wird ein besonders akkurates Verfahren benötigt, das die Erfassung der Rohdaten konstant und robust vollzieht. Ein weiterer wichtiger Punkt für die Signalerfassung mit dem System ist das Detektionslimit der Optik-Einheit. Da mehrere der klinischen Parameter in sehr niedrigen Konzentrationen zu messen sind, muss das System über eine sehr empfindliche Detektion verfügen. Für die Verifizierung der Ergebnisse werden die Kenndaten mit einem kommerziellen Biochipreader verglichen, der in der Lage ist diese Anforderungen zu erfüllen. Des Weiteren ist der dynamische Messbereich ein wichtiger Kennwert. Auf einem Chip sollen mehrere Parameter gemessen werden, um die benötige Parallelität zu gewährleisten. Da die Parameter in stark divergierenden Konzentrationen auftreten können, können auch die Signale der Mikrospots stark variieren. Die Signale müssen trotzdem von der Optik-Einheit quantitativ aufgelöst werden. Des Weiteren wird die Reproduzierbarkeit der gesamten Signalerfassung untersucht. Die nach Kapitel 7.3 „Chips zur Charakterisierung der Optik“ prozessierten Wellenleiterchips werden für die beschriebene Charakterisierung des Detektionslimits und des dynamischen Bereichs der Optik-Einheit verwendet. Für eine Charakterisierung werden spezifisch die Fluoreszenzsignale eines Mikroarrays betrachtet und deshalb wird der Einfluss der Fluidik und der Immun-Tests ausgeklammert, um rein die Charakteristika der Optik-Einheit zu bestimmen.

12.1 Nachweisgrenze

Für diesen Versuch wird das WLS in den direkten Vergleich mit einem hochwertigen, kommerziellen Biochipreader gestellt. Die Nachweisgrenze (NWG) wird aus dem Mittelwert des Nullsignals des Hintergrunds $\overline{p}_b$ (nach Abb. 33 „Signalanalyse“, S. 71) und dessen Standardabweichung σ_b mit NWG = ($\overline{p}_b$ + 3 σ_b) berechnet. Wichtig hierbei ist, dass für diese Berechnung allein das Signal des Mikrospots analysiert wird, deshalb entspricht p_b dem Signal des Hintergrunds. Somit werden nur Mikrospotintensitäten überhalb der NWG als nachweisbar definiert.

Für den direkten Vergleich werden identische Chips im Biochipreader Axon GenePix 4200A und im WLS ausgelesen und analysiert. Somit sind Variationen in der Chipproduktion bei der Charakterisierung ausgeschlossen. Die Einstellungen des Axons lagen bei 100 % Laserleistung und 600 V Photomultiplier-Verstärkung. Um die Wellenleiterchips im Axon analysieren zu können, wird ein spezieller Halter angefertigt. In Abb. 31 sind die Mikroarraybilder a) des WLS und b) des Axons dargestellt.

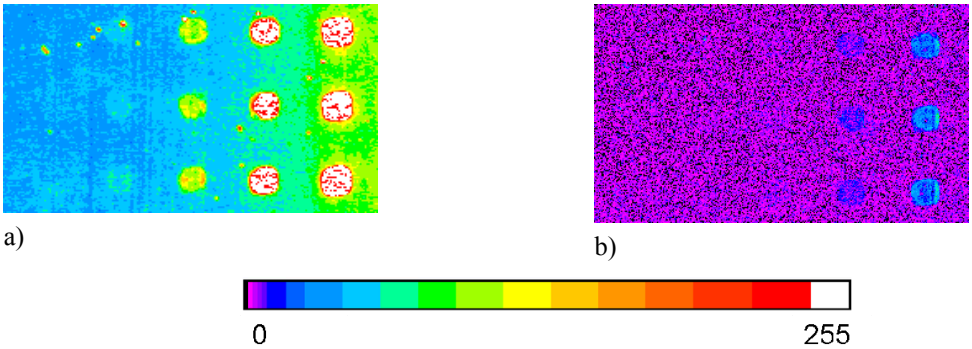


Abb. 31 Detektion von Mikroarrays
a) WLS, Integrationszeit der Kamera 10s, 100 % Laserleistung
b) Axon GenePix 4200A, 100 % Laserleistung, PMT 600V

Für einen besseren optischen Vergleich werden die Bilder in identischer Farbskala abgebildet. Auf den Bildern ist ein Ausschnitt der 1:5 Konzentrationsreihe ab $4x10^{-9}$ M von links nach rechts in je acht Spotreplika zu sehen. Hierbei ist zu erkennen, dass das WLS annähernd zwei Reihen geringerer Konzentrationen detektieren kann.

Tabelle 6 Nachweisgrenze der Biochipreader

Chip Nr.	Axon [M]	WLS [M]	Faktor
1	$8x10^{-10}$	$1,6x10^{-10}$	5
2	$4x10^{-9}$	$1,6x10^{-10}$	25
3	$4x10^{-9}$	$1,6x10^{-10}$	25
4	$8x10^{-10}$	$3,2x10^{-11}$	25
5	$4x10^{-9}$	$1,6x10^{-10}$	25
6	$2x10^{-8}$	$8x10^{-10}$	25
		Gesamtfaktor	21,8

In Tabelle 6 ist die NWG der Biochipreader aufgelistet. Der „Faktor“ gibt an, um wie viel das WLS sensitiver gegenüber dem Axon Laserscanner ist. Er wird aus dem Quotient der Nachweisgrenzen der zwei Systeme gebildet (Axon/WLS). Über die sechs Versuche gemittelt, ergibt sich hierbei ein Gesamtfaktor von ca. 22 höherer Sensitivität für das WLS. Die NWG des WLS in dieser Versuchsreihe liegt im Mittel bei ca. $2,45x10^{-10}$ M, welche mit einem Fehler von 113 % belastet ist. In einem weiteren Versuch wurde mit n = 4 Chips eine mittlere NWG von $3xE^{-11}$ M mit einem Fehler von 51 % für das WLS ermittelt. Die Spannweite der NWG aller Versuche reicht somit von $6,4x10^{-12}$ M bis $8x10^{-10}$ M. Somit ist der Prozess zur Herstellung der Chips zwar sehr stark fehlerbehaftet, jedoch eignen sich identische Chips zum Vergleich der NWG zwischen Laserscanner Axon und dem WLS gut für den Systemvergleich.

Einschub:
Hervorzuheben ist, dass der LOD eines Immun-Tests nicht vom Signal des Hintergrunds, sondern vom Signal der Null-Probe abhängt (siehe Kapitel 3.4 „Analyse von Biochipsignalen“). Da die Nullprobe auch von einem Laserscanner, wie dem Axon, detektiert werden kann, weisen die Systeme für den LOD für Immun-Tests sehr ähnliche Werte auf. Würde auf der Seite der Immun-Tests der Effekt der erhöhten Null-

Probe reduziert werden können, könnte hier das WLS System jedoch deutlich sensitiver detektieren.

Eine wichtige Kenngröße von Biochip-Systemen ist die vom Immun-Test unabhängige NWG, welche in Fluorochrome/μm^2 als Einheit angegeben wird. Für den Axon wird diese NWG im Produktblatt mit 0,1 Fluorochromen/μm^2 angegeben, wobei hierfür die Methode zur Bestimmung des Kennwerts nicht ermittelt werden konnte. Im Folgenden wird daher für das WLS anhand der gewonnenen Daten diese Kenngröße mittels einer eigenen Methode berechnet. Hierzu müssen mitunter verschiedene Hypothesen aufgestellt werden. Da die mit Fluoreszenz markierten Moleküle in Dimethylsulfoxid gelöst sind (siehe Kapitel 7.3), ergibt sich laut [50] auf mit Aminosilan modifizierten Glasoberflächen ein Kontaktwinkel von ca. 30 °. Somit wird angenommen, ein Mikrospot hat diesen Kontaktwinkel. Durch die Annahme, dass der Tropfen die Geometrie einer Kugelschalotte aufweist, kann das Volumen des Mikrospots berechnet werden mit:

Gleichung 29 Berechnung des Volumens eines Kugelschnitts [51]

$$V = \frac{1}{6}\pi \cdot h \cdot (3r_T^{\,2} + h^2)$$

mit näherungsweise

$$h = \tan\left(\frac{\Theta}{2}\right) \cdot r_T$$

V = Volumen des Kugelschnitts [m^3]
π = Kreiszahl [3,141…]
h = Höhe des Kugelschnitts [m]
r_T = Radius des Schnittkreises [m]
Θ = Kontaktwinkel [°]

Durch Einsetzen des Radius eines Spots mit r_T = 135 µm und einem Kontaktwinkel von Θ = 28,9 ° ergibt sich näherungsweise ein Volumen von V = $1{,}03 \times 10^{-12}$ m^3, also ca. 1 nl. Nach Gleichung 30 befinden sich nach Einsetzen der Avogadrokonstante N_A, einer angenommenen Nachweisgrenze des WLS mit c = 1×10^{-11} M und dem Mikrospotvolumen von V = 1,03 nl N = 6953 Moleküle im Mikrospot.

Gleichung 30 Berechnung der Anzahl der Moleküle [32]

$$N = n \cdot N_A$$

mit

$$n = c_{NWG} \cdot V$$

N = Teilchenanzahl [ ]
n = Stoffmenge [mol]
N_A = Avogadrokonstante [$6{,}022 \times 10^{23}$ mol^{-1}]
V = Volumen des Kugelschnitts [l]
c_{NWG} = Konzentration der Nachweisgrenze [M]

Die Fläche eines Mikrospots beträgt 57574 μm^2, wodurch sich eine Kenngröße von NWG = 0,12 Fluorochromen/μm^2 ergibt, wenn alle im Spot befindlichen Moleküle an die Oberfläche gebunden haben. Berücksichtigt man noch, dass der Hersteller der Farbstoffe eine Funktionalität der Reaktivität der Aminogruppen von > 50 % [33] angibt und hiervon noch 15 % durch Blocken abgewaschen werden, ergibt sich somit die NWG = 0,037 Fluorochromen/μm^2 für das WLS. Wie oben beschrieben, erbrachte das WLS im direkten Vergleich zum Axon eine ca. um Faktor 21 sensitivere Detektion im

Versuch. Der Faktor bezogen auf die Angabe des NWG des Axons mit 0,1 Fluorochromen/μm^2 ist hier jedoch nur 2,7-fach sensitiver. Diese Diskrepanz wird vermutlich durch die Annahme verursacht, dass alle funktionellen Farbstoffe im Mikrospot binden und diese nach dem Vorgang des Blockens auch nicht abgewaschen werden. Zu berücksichtigen ist zusätzlich, dass der Fehler in der Berechnung dieser Kenngröße in Fluorochromen/μm^2 allein durch die gewonnen Daten der NWG stark schwankt. Wie oben beschrieben, wurde bei einem Chip für die NWG des WLS eine Konzentration von $8x10^{-10}$ M bestimmt, was mit der obigen Berechnung zu einer Bestimmung von 3 Fluorochromen/μm^2 führt; was auf eine schwache NWG des WLS schließen würde. Die minimal nachgewiesene Konzentration von $6{,}4x10^{-12}$ M führt zu einer NWG von 0,02 Fluorochromen/μm^2. Dieser Kennwert würde auf eine 5-fach höhere Sensitivität des WLS im Vergleich zum Axon schließen lassen. Die Methode zur Bestimmung der NWG der Axons konnte nicht ermittelt werden; wahrscheinlich unterscheidet sich diese aber wesentlich von der vorgestellten Methode. Der direkte Vergleich des WLS mit dem Axon mit identischen Chips ermöglicht jedoch eine konkrete Aussage über die Sensitivität des WLS.

Zusammengefasst besitzt das WLS ausreichend Sensitivität für die Detektion von Immun-Tests und bietet im Vergleich zu kommerziellen Laserscannern sogar weitere Kapazität zur Detektion von schwächeren Fluoreszenzsignalen.

12.2 Dynamischer Bereich

Die Ermittlung des dynamischen Bereichs der Optik-Einheit des WLS spielt für die Detektion von Immun-Tests eine große Rolle. Dieser Bereich gibt an, in welcher Signalspanne sich auswertbare Spot-Intensitäten auf einem Wellenleiterchip befinden können. Da bei den Biochips benachbarte Spots unterschiedliche klinische Parameter messen sollen, können hier hohe Signalvarianzen auftreten. Um diese maximal messbare Signalspanne des WLS zu ermitteln, werden auf die Wellenleiterchips Konzentrationsreihen mit 1:10 Abstufungen gespottet. Für diesen Versuch kommt weniger die Anzahl der Chipreplika zur Geltung, da der dynamische Bereich innerhalb eines Chips ermittelt wird. Daher werden acht Replika per Spot pro Spalte auf einem Chip und davon zwei Chipreplika prozessiert. In Abb. 32 ist eine Spalte der acht Replika dargestellt.

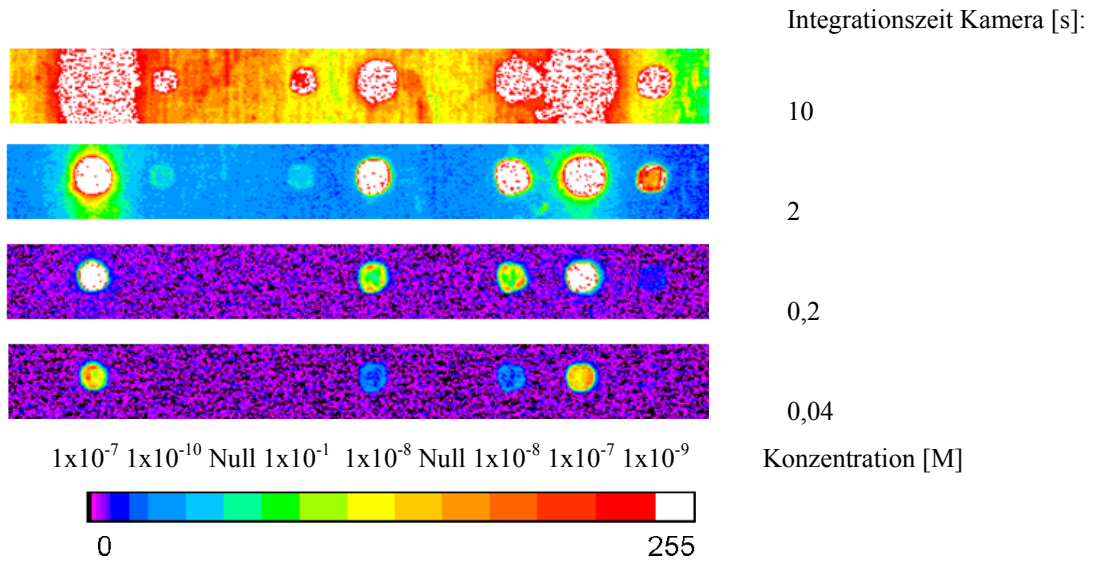


Abb. 32 Dynamischer Bereich im WLS

Aufnahme mehrerer Bilder in aufsteigender Integrationszeit eines Mikroarrays mit dem WLS. Die Konzentration des Farbstoffs ist in 1:10 Variationen von $1x10^{-7}$ M bis $1x10^{-10}$ M immobilisiert. Die Integrationszeit der Kamera beträgt 0,04 - 10 s bei 4 Bildern mit 100 % Laserleistung.

Zu sehen ist eine Variation der Konzentration in 1:10 Abstufungen zwischen $1x10^{-7}$ M bis $1x10^{-10}$ M. Die Anordnung der Spots ist so gewählt, dass auch Konzentrationen nahe dem LOD mit $1x10^{-10}$ M direkt neben sehr hohen Konzentrationen mit $1x10^{-7}$ M positioniert sind, um einen hohen Unterschied der Konzentration des Analyten in Immun-Tests zu simulieren.

Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass mindestens drei Dekaden des dynamischen Bereichs von $1x10^{-7}$ M bis $1x10^{-10}$ M vom WLS detektiert werden können, auch wenn die Signale nahe beim LOD liegt. Durch die Variation der Integrationszeit von 0,04-10s kann die 8-bit CCD-Kamera alle Signale detektieren. Das bedeutet, die niedrige Konzentration und die höchste Konzentration sind quantifizierbar. Für die Durchführung von Immun-Tests sind kaum Signale über dem von $1x10^{-7}$ M zu erwarten. Daher kann festgehalten werden, dass das WLS über genügend Dynamik verfügt, um Multiparameter-Immun-Tests auf einem Chip zu detektieren. Zusätzlich konnte die Funktionalität zur Berechung der „Normierung der Intensität der Integrationszeit“, die in Kapitel 8.1.2 beschrieben ist und nach Gleichung 27 berechnet wird, praktisch verifiziert werden.

12.3 Bestimmung der Mikrospot-Intensität

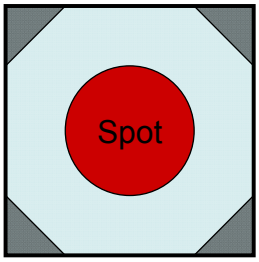


Abb. 33 Signalanalyse
Durch Mustererkennung wird die Bestimmung der Mikrospot-Intensität gestützt. In den grauen Dreiecken wird das Signal des Hintergrunds bestimmt.

Die Erfassung der Rohdaten von Mikroarrays benötigt ein robustes und reproduzierbares Verfahren. Zu Beginn der Arbeit stand eine Methode zur Erfassung des Nutzsignals zur Verfügung. Diese wurde weiterentwickelt und optimiert. In diesem Kapitel werden die ursprüngliche und die optimierte Methode miteinander verglichen. Anhand von Abb. 33 wird die Aufnahme der Rohdaten erklärt. Um das Nutzsignal des Spots zu ermitteln, muss der Hintergrund von diesem Signal abgezogen werden. Der Hintergrund wird entlang der Pixel der schwarzen Linie und den grauen Dreiecken gebildet. Hierzu gilt:

Gleichung 31 Bestimmung einer Spot-Intensität in konstanter Fläche

$$s = \sum_{i=0}^{n} \left(p_i - \tilde{p}_b \right)$$

s = Nutzsignal
$\tilde{p}_b$ = Median der Intensität der Pixel im grauen Bereich und entlang der schwarzen Linie
p_i = Intensität Pixel innerhalb der schwarzen Linie

Als Resultat der Gleichung 31 wird ein Integral über die gesamte Fläche innerhalb der schwarzen Linie gebildet. Von jedem einzelnen Pixel in dieser Fläche wird der Median des Hintergrunds p_b abgezogen. Somit bleibt nur noch das Nutzsignal s (rote Fläche), aus welchem die Rohdaten weiter verrechnet werden. Zu Beginn der Arbeit wurde der Hintergrund aus der Summe der Pixel auf der schwarzen Linie gebildet. Somit war die Anzahl der Pixel zur Bestimmung des Signals des Hintergrunds sehr gering. Leichte Verschmutzungen und Artefakte im Bereich des Hintergrunds verursachten eine fehleranfällige Aufnahme des Nutzsignals. Zusätzlich wurde zuvor das Nutzsignal a durch folgende Berechnung gewonnen:

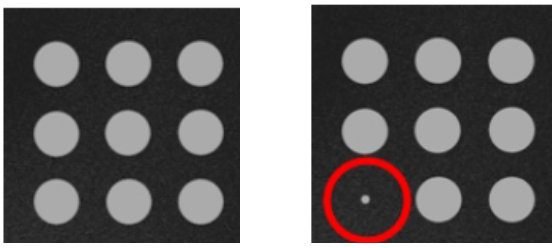
Gleichung 32 Bestimmung einer Spot-Intensität durch Nachweisgrenze

$$a = \frac{\sum_{i=0}^{n} \left(p_i - (\bar{p}_b + 3 \cdot \sigma_b) \right)}{n}$$

a = Nutzsignal
$\bar{p}_b$ = Mittelwert des Hintergrunds entlang der schwarzen Linie
σ_b = Standardabweichung des Hintergrunds entlang der schwarzen Linie
p_i = Intensität der Pixel innerhalb der schwarzen Linie
n = Anzahl der Pixel mit a > 0

Als Resultat der Gleichung 32 werden somit nur Intensitäten von Pixeln erfasst, die sich überhalb der Nachweisgrenze befinden. Zusätzlich wurde der Mittelwert der Summe der

Pixel mit a < 0 gebildet, indem sie durch die Anzahl n mit Pixeln a > 0 geteilt wird. Anhand künstlich erstellter Mikroarrays können die zwei Methoden miteinander verglichen werden. Abb. 34 zeigt Mikrospots, die in einem Graphikverarbeitungsprogramm erstellt wurden. Die Intensität der Spots beträgt konstant den Grauwert 100. Diese Spots werden auf ein typisches und geringes Rauschen der CCD-Kamera gelegt. In Abb. 34 a) sind Spots konstanter Größe zu sehen, in b) ist wiederum ein identisches Rauschen unterlegt und ein Spot mit geringer Größe, dessen beinhaltende Pixel aber dennoch die identische Intensität aufweisen.



a) b)

Abb. 34 Künstlich hergestellte Mikroarrays

a) Konstante Mikroarray Intensität

b) Konstante Mikroarray Intensität mit rot markiertem Spottingfehler

Alle Mikrospots der Abbildungen weisen konstant den Grauwert 100 auf. Die Spots befinden sich auf einem leicht rauschenden Hintergrund, in b) ist zusätzlich ein Spot mit kleinerem Umfang eingebracht.

Der Vorteil des Vergleichs der zwei verschiedenen Methoden zur Signalanalyse mit künstlichen Daten liegt darin, dass das optimale Ergebnis bekannt ist. In Abb. 34 a) sollte der Variationskoeffizient der Spotreplika sehr gering sein. Die Berechnung des Variationskoeffizienten zeigt für die Methode „Spot-Intensität in konstanter Fläche“ eine Abweichung von 0,6 %, während die Bestimmung der „Spot-Intensität durch Nachweisgrenze“ 1,6 % beträgt. Da in den künstlichen Daten die Form und Intensität der Spots ausnahmslos konstant sind und der einzige Störeinfluss das geringe Rauschen des Hintergrunds ist, ist die Methode zur Bestimmung des Nutzsignals s mit einem um Faktor 2,6 kleineren Variationskoeffizienten der Methode des Nutzsignals a deutlich überlegen. Grund hierfür ist, dass die Bildung des Medians der Methode des Nutzsignals *s* robuster ist, als die Bildung eines Mittelwerts über den Hintergrund. Für Abb. 34 b) beträgt der Variationskoeffizient für die Bestimmung des Nutzsignals a mit Spottingfehler wiederum 1,5 %. Somit wurde der kleine Spot nicht als Spottingfehler erkannt. Dies ist vor allem durch die Bildung des Mittelwerts zur Bestimmung des Nutzsignals a zu erklären, da hier die Größe des Spots vernachlässigt wird. Da eine konstante Größe der Mikrospots jedoch ein Qualitätsmerkmal ist, ist dies eine fehlerhafte Erfassung des Nutzsignals. Im Vergleich hierzu zeigt die Bestimmung des Nutzsignals s einen Variationskoeffizienten von 30 %. Der fehlerhafte Spot weist ein 5,8-fach geringeres Nutzsignal s auf und kann somit deutlich als Spottingfehler erkannt werden. Zusammengefasst ist die Methode zur Bestimmung einer Spot-Intensität in konstanter Fläche eine robuste und exakte Methode für die Signalanalyse von Mikrospots. Nach der Bestimmung des Nutzsignals s wird dieses mit der Gleichung 27 „Normierung der Intensität der Integrationszeit“ aus Kapitel 8.1.2 berechnet, um den dynamischen Signalbereich zu erweitern.

12.4 Untersuchung der Reproduzierbarkeit

Die Optik-Einheit des WLS kann durch den Laser oder die Auswertung Schwankungen verursachen. Im Folgenden wird die Optik-Einheit ohne Immun-Test mit fluoreszierenden Chips auf Reproduzierbarkeit untersucht. Hierzu wird ein markiertes IgG direkt auf der Epoxid-Schicht mit 4 mg/l immobilisiert und gespottet nach Kapitel 7.4.

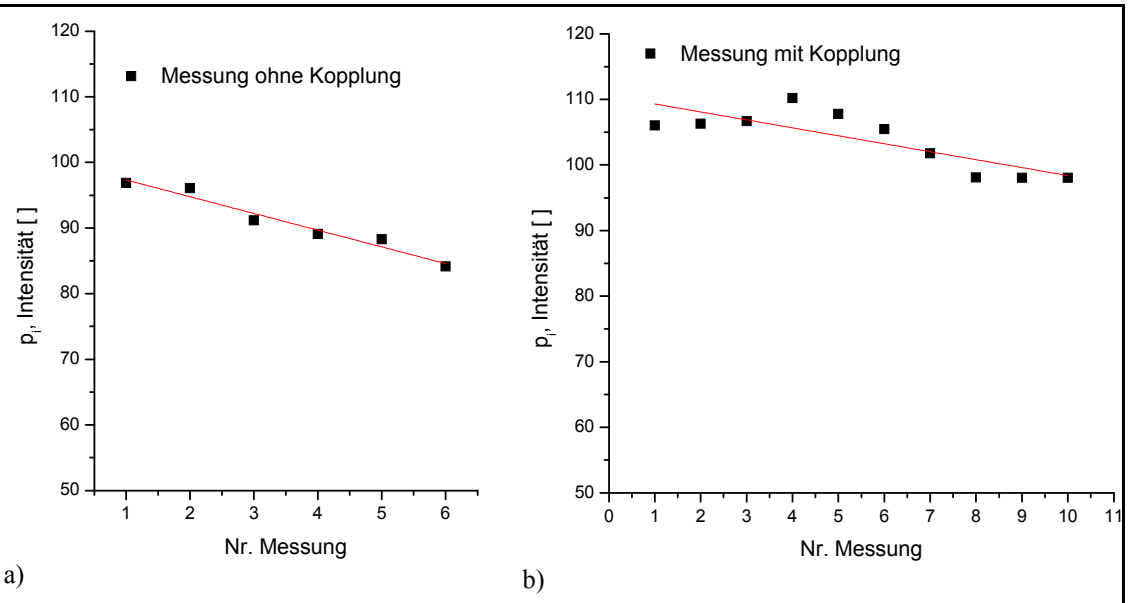


Abb. 35 Untersuchung der Optik-Einheit
a) 6-maliges Signalaufnahme und Auswertung eines 2x11 Arrays ohne Koppelfunktion
b) 10-maliges Signalaufnahme und Auswertung eines 2x11 Arrays mit Koppelfunktion

In Abb. 35 a) sind mehrere Messungen eines Chips mit einem Array von 2x11 Spots gleicher Konzentration ausgelesen worden. Hierbei wird nur einmal zu Beginn der Messreihe eingekoppelt, d. h. die Messung zeigt die Varianz der Signalaufnahme und Auswertung. Da für die Messung immer derselbe Chip verwendet wird, spielen Variationen des Wellenleiterchips selbst keine Rolle. Zu sehen ist ein nahezu linearer Abfall der gemittelten Arrayintensität, diese ist durch Ausbleichen der Farbstoffe zu erklären. Farbstoffe bleichen mit zunehmender Belichtungsdauer aus. Zur Berücksichtigung dieses Effekts kann über einen angepassten Fit der Fehler der Einzelmessungen ohne das Bleichen bestimmt werden, so liegt der Variationskoeffizient bei nur 1,1 % bei der Messung ohne Koppelfunktion. Der Laser, die Kamera, also die Signalerfassung und die Auswertung der Mikrospots, sind folglich akkurat, da dieser Fehler sehr gering ist.

In Abb. 35 b) sind mehrere Messungen eines Chips mit einem Array von 2x11 Spots gleicher Konzentration ausgelesen worden, bei dem für jede Einzelmessung neu gekoppelt wird, d. h. in diesem Diagramm ist der Koppelfehler und die Fehler der Signalaufnahme und Auswertung mit inbegriffen. Nach linearem Fit, für die Berücksichtigung des Ausbleichens der Farbstoffe, liegt der Variationskoeffizient bei 2,6 %. Somit ist die Effizienz der Koppelfunktion gezeigt, der Ablauf ist reproduzierbar. Messungen mit

n = 20 verschiedenen Chips, die jeweils neu in das Gerät eingelegt, eingekoppelt und analysiert werden, zeigten einen Variationskoeffizient von < 20 %. Vereinzelt auftretende, stark fehlerbehaftete Ausreißer können diesen Wert allerdings drastisch verschlechtern. Hierbei können jedoch Fehler in der Beschichtung, im Spotting und im Wellenleiterchip nicht vom Fehler der Optik-Einheit getrennt werden. Diese Aspekte werden im Kapitel 16 „Fehlerquellen für das Wellenleitersystem“ behandelt.

Zusammengefasst weisen die Methode der Koppelfunktion, der Signalaufnahme und die Auswertung der Signale einen geringen Fehlereinfluss auf. Auch das Einkoppeln mehrer Chips weist akzeptable Reproduzierbarkeit auf, das System ist stabil.

13 Fluidik-Einheit

Ein POCT-System für die Diagnose von Sepsis muss in der Lage sein den Immun-Test zu prozessieren. Hierfür muss eine Fluidik-Einheit gleichzeitig bindungsinhibitierende und nicht-kompetitive Tests durchführen, welche die Nachweisreaktion für die klinischen Parameter sind, siehe Kapitel 3.5. Das beinhaltet, dass das System die Funktionen Verdünnen, Dosieren, Mischen, Vorinkubation und Inkubation durchführen muss. Das Verdünnen dient der Reduzierung von Matrix-Effekten; dient also der Unterdrückung ungewollter, unspezifischer Reaktionen durch Bestandteile in humanem Plasma. Das Mischen muss korrekt vollzogen werden, um eine homogene Verdünnungslösung für nicht-kompetitive Tests zu erhalten und gleichzeitig stellt es die Basis für die Durchführung von Bindungsinhibitions-Tests (siehe Kapitel 3.5.4) dar. In den folgenden Kapiteln werden die nötigen fluidischen Operationen im Einzelnen verifiziert, die für die Durchführung der Immun-Tests notwendig sind. Als Resultat wird ein Protokoll formuliert, in dem der optimale Ablauf für die Durchführung eines Immun-Tests festgehalten wird.

13.1 Multilamination und Dosierung

In 4.6.2 „Dispersion“ ist beschrieben, dass es vorteilhaft ist, die über den Chip geführten Proben oder Sonden durch Luftsegmente vom Systempuffer zu trennen, um Verdünnung zu minimieren. Zusätzlich ist in den Kapiteln 3.5 „Formate von Immun-Tests“ beschrieben, dass akkurate Dosierung notwendig ist, um Immun-Tests zu prozessieren. Um dies zu verifizieren, wird mit Tinte als Farbstoff, einem Laser und einer CCD-Kamera gezeigt, dass sich durch Luftsegmente getrennte Fluidsegmente nicht mischen und sich die Fluide akkurat dosieren lassen. Der Messaufbau ist in Kapitel 9.2 beschrieben. Die Dosierung stellt eine Multilamination von Luft mit Puffer bzw. Tinte her. Die Multilamination stellt eine Grundvorrausetzung für das Mischen dar, welches im folgenden Kapitel untersucht wird. Hier soll vor allem die Genauigkeit der Dosierung und die Funktionalität der Trennung durch Luftsegmente untersucht werden. Der Laser leuchtet hierzu einen Teil des Teflonschlauchs (Material: FEP, 0,8 mm Durchmesser) aus, in dem sich die Fluide befinden. Da Tinte das Laserlicht am stärksten absorbiert, ist

die aufgenommene Intensität des transmittierten Lichts durch die Kamera am niedrigsten. Luftsegmente hingegen erscheinen in ca. 7,5-fach höherer Intensität, Puffer nochmals ca. 1,3-fach höher. Die Gegebenheiten sind in Abb. 36 zu sehen.

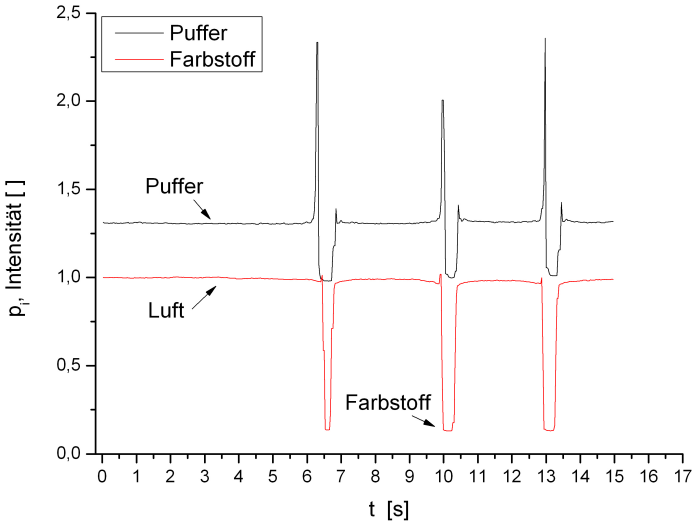


Abb. 36 Trennung durch Luftsegmente

Die x-Achse zeigt die Zeitskala des Prozesses, in dem mit 8,3 µl/s die verschiedenen Fluid- und Luftsegmente im Schlauch am Detektor vorbei geführt werden. Die y-Achse zeigt gemittelte Grauwerte p_i des transmittierten Lichts durch den Schlauch, welche vom Detektor erfasst werden.

Die starken Peaks des Puffers sind durch Streulicht verursacht und können vernachlässigt werden.

Die Messreihe „Puffer“ in Abb. 36 zeigt die Multilamination vom Puffer mit Luft. Daher ist deutlich zu sehen, wo sich bei einem Immun-Test die Probe befinden wird, nämlich an identischer Position zur Luft. Im Gegensatz hierzu zeigt die Messreihe „Farbstoff“ denselben Ablauf, jedoch ist hier die Probe durch Tinte ersetzt und ist von Luftsegmenten umgeben. Anhand dieser zwei Messungen können Rückschlüsse auf die Multilamination, die Dosierung und die Unterdrückung der Dispersion durch Trennung mit Luftsegmenten gezogen werden:

Multilamination und Dosierung:

Die Messreihen „Puffer“ und „Farbstoff“ zeigen, dass die Segmentierung in Fluidsegmente sehr akkurat und präzise abläuft. Luft- bzw. Farbstoffsegmente befinden sich reproduzierbar an identischer Position im Schlauch. Die Überlagerung der zwei Graphen zeigt besonders, wie genau diese Operation vollzogen wird. Anhand der Messdaten lässt sich ermitteln, dass die Probe innerhalb von ca. 6,4 - 6,8 s, 10 - 10,3 s, 12,9 - 13,4 s den Detektor passiert. Rückgerechnet mit dem geförderten Volumen von 8,3 µl/s ergibt sich hieraus die Menge von 3 µl, 3 µl und 4 µl. Somit ergibt die Summe des Volumens die gewünschten 10 µl. Die Funktion des Ventils und der Pumpe ist damit nachweislich fehlerfrei justiert und die Dosierung von Luft- und Fluidsegmenten sehr exakt, wie es von einer Spritzenpumpe zu erwarten ist.

Unterdrückung der Dispersion:
Anhand der Messreihe „Farbstoff“ ist zu sehen, dass die Signale der Tintensegmente annähernd ein Rechtecksignal bilden. Das lässt darauf schließen, dass nahezu kein Farbstoff in der Luftgrenze zurückbleibt. Der Variationskoeffizient des Tintensignals zwischen 0 – 15 s beträgt nur 2,5 % und der des Puffersignals aus „Puffer“ nur 0,7 %.

Zusammengefasst werden durch die Fluidik-Komponenten exakt positionierte und dosierte Mengen an Fluid- und Luftsegmenten hergestellt. Die Trennung durch Luftsegmente unterdrückt die Dispersion so stark, dass mit dieser Messanordnung eine Verschleppung nicht nachgewiesen werden konnte.

13.2 Mischen durch Taylor-Dispersion

Nach dem Prinzip der Taylor-Dispersion (Kapitel 4.6.2) soll mit einem Versuch mit Farbstoff gezeigt werden, dass eine homogene Mischung entsteht, wenn Fluid-Segmente hergestellt werden, wie in Kapitel 13.1 verifiziert. Ziel hierbei ist es die multilaminierten Fluidsegmente zu mischen, ohne diese Segmente mit dem umgebenden System-Puffer zu mischen. Das bedeutet, dass auf der einen Seite das Mischen erwünscht ist und auf der anderen Seite soll es unterbunden werden.

Dabei entspricht, wie in Kapitel 13.1, die Patientenprobe einem Farbstoff (Tinte) und die Detektionsantikörper des Bindungsinhibitions-Tests dem Puffer. Also werden drei Segmente Farbstoff mit drei, drei und vier µl mit vier umgebenden Segmenten Puffer mit 27, 26, 21 und 16 µl hergestellt. In Summe ergibt sich daraus 10 µl Farbstoff und 90 µl Puffer, was somit einer 1:10 Verdünnung entspricht. Diese Mischung ist durch Luftsegmente vom System-Puffer abgegrenzt, um hier eine Verdünnung der Lösung zu unterdrücken. In Abb. 37 ist das Resultat nach fünfmaligem Vor- und Rückwärtspumpen der Mischung mit 8,3 µl/s und einer anschließenden Wartezeit von 30 Sekunden festgehalten. Zur Aufnahme der Messdaten wird die Mischung wiederum im Schlauch von einem Laser ausgeleuchtet und an einer Kamera vorbeigeführt (Messaufbau siehe Kapitel 9.2), um die Homogenität der Mischung zu überprüfen.

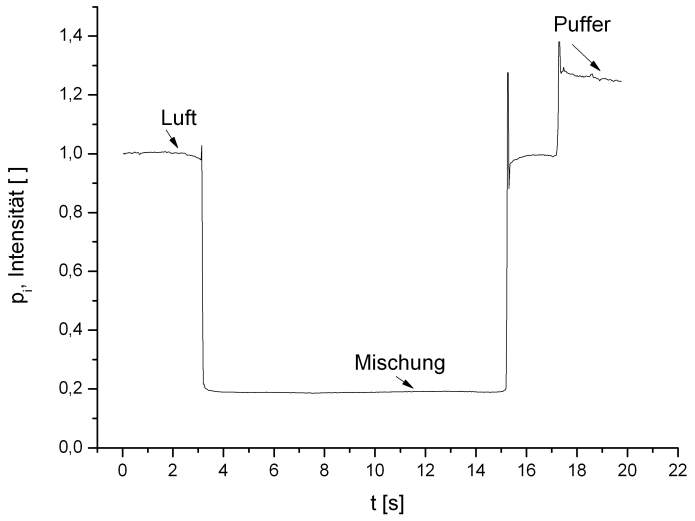


Abb. 37 Profil der Mischung

Die x-Achse zeigt die Zeitskala des Prozesses, in dem mit 8,3 µl/s die verschiedenen Fluid- und Luftsegmente im Schlauch am Detektor vorbei geführt werden. Die y-Achse zeigt gemittelte Grauwerte p_i des transmittierten Lichts durch den Schlauch, welche vom Detektor erfasst werden.

Den Messdaten aus Abb. 37 ist zu entnehmen, dass die Mischung den Detektor zwischen ca. 3,2 s und 15,3s passiert. Rückgerechnet mit dem Fördervolumen von 8.3 µl/s ergibt sich eine Probenmenge von 100 µl. Es befinden sich keine Luftblasen innerhalb der Mischung, was die Operation als Fehlerquelle stören würde. Auch keine messbaren Gradienten der Tinte-Puffer-Mischung sind auszumachen. Der Intensitätswert des transmittierten Lichts bei reiner Tinte liegt bei ca. 0,15 (siehe Abb. 36), der des Puffers bei ca. 1,2. Das Mischungsverhältnis Tinte zu Puffer liegt bei 1 zu 10. Somit weist der Intensitätswert der Mischung mit ca. 0,2 ein vergleichsweise niedriges Signal auf, dennoch sollten Schwankungen der Mischung erfasst werden können. Der Variationskoeffizient der Mischung beträgt 1,7 % und kann daher als homogen betrachtet werden.

13.3 Einstellung der optimalen Inkubationsphase

13.3.1 Eruierung des Inkubationsbereichs

Für die Durchführung der nicht-kompetitiven Tests werden die Detektionsantikörper auf dem Chip über das System von Schläuchen und Ventilen in die Flusszelle geführt. Für die optimale Durchführung von Immun-Tests ist es deshalb notwendig das Fluidik-System so einzustellen, dass die Detektionsantikörper in maximaler Konzentration in der Flusszelle vorliegen. Da die Flusszelle beim Einbringen der Mischung aus Probe und den Sonden des Bindungsinhibitions-Tests nicht gefüllt ist, kann diese Einstellung einfach durch Kontrollieren der transparenten Schläuche gemacht werden. Die nicht-kompetitiven Sonden sind zwar durch Luftblasen vom System getrennt, um die Taylor-Dispersion (siehe Kapitel 4.6.2) zu minimieren, aber nach Durchtritt der Blasenfalle werden diese entfernt. Da an dieser Stelle die Flusszelle bereits gefüllt ist, muss dieser

Effekt berücksichtigt werden, um die optimale Inkubationsphase zu bestimmen. Für die Einstellung der Inkubationsphase für die nicht-kompetitiven Sonden wird ein Test mit $8x10^{-6}$ M des Farbstoffs Alexa 647 durchgeführt. Zu Beginn des Tests wird diese Lösung durch Luftsegmente getrennt, wie in Kapitel 13.2 beschrieben, und vor der Blasenfalle positioniert. Hier beginnt die Aufnahme der Signale bei t = 0 s nach Abb. 38. Nun wird der Farbstoff mit 2,1 µl/s zur Flusszelle befördert und die Blasenfalle entfernt die Luftsegmente. Währenddessen wird ein Wellenleiterchip im Gerät ausgeleuchtet und die Kamera nimmt Fluoreszenzbilder im Intervall von zwei Sekunden über eine definierte Fläche auf dem Chip auf. Die ausgewerteten Bilder ergeben den Graph in Abb. 38.

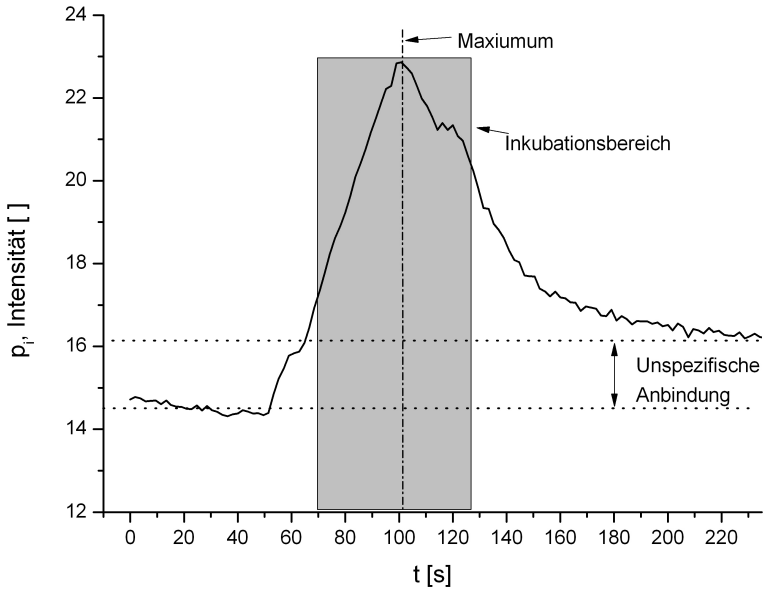


Abb. 38 Eruierung des Inkubationsbereichs

Die x-Achse zeigt die Zeitskala des Prozesses, in dem mit 2,1 µl/s Fluoreszenz-Farbstoff durch die Flusszelle transportiert wird. Die y-Achse zeigt gemittelte Grauwerte p_i der CCD-Kamera, die im WLS die Fluoreszenz auf dem Chip detektiert.

Die x-Achse zeigt in zeitlicher Auflösung das von der Spritzenpumpe mit 2,1 µl/s beförderte Volumen des Farbstoffs an. Auf der y-Achse ist die ausgewertete Intensität der Fluoreszenz ablesbar. Beim Anstieg der Intensität erreichen die ersten Farbstoffmoleküle die Flusszelle. Das Signal nimmt bis zu einem Maximum bei 104 Sekunden zu, dann nimmt es wieder ab. Nach Rückrechnung des beförderten Volumens mit 2,1 µl/s ergibt sich daraus, dass sich das Maximum bei ca. 220 µl gefördertem Volumen befindet. Da der Wellenleiterchip mit keiner Oberflächenchemie behandelt ist, können die Farbstoffe wieder abgewaschen werden, bis auf eine restliche unspezifische Anbindung. Anhand dieser Resultate kann nun festgelegt werden, dass zwischen ca. 70 - 128 Sekunden bzw. ca. 150 – 270 µl gefördertem Volumen der Bereich für eine optimale Inkubation liegt, da in diesem Bereich die Steigung und die Höhe des Signals am höchsten sind. Anhand dieser Messung ist auch die Dispersion der 100 µl Sonden-Lösung zu sehen, die sich

mit dem Systempuffer vermischt und so die Steigung des Signals reduziert, ohne Vermischung würde sich ein Rechtecksignal mit einer Spannweite von ca. 48 s ausbilden. Ohne Trennung mit Luftsegmenten ist dieser Effekt noch stärker ausgeprägt.

13.3.2 Verifizierung des Inkubationsbereichs

Um die gewonnenen Daten des Inkubationsbereichs aus Kapitel 13.3.1 zu verifizieren, wird ein nicht-kompetitiver Test mit CRP in den Inkubationsbereichen 70-130 s, 65-105 s und 85-128 s durchgeführt; die Bereiche der Inkubation sind somit mit den Angaben aus Abb. 38 vergleichbar. Rückgerechnet mit dem Fördervolumen von 2,1 µl/s ergeben sich hieraus geförderte Volumen von 150-270 µL, 140-224 µL und 180-270 µL. Im Inkrement von 7 µl gefördertem Volumen werden die jeweiligen Bereiche mit einer Stoppzeit von 20 und 40 Sekunden abgerastert, um die Probe zu inkubieren. Im Anschluss werden die Signale der Versuche miteinander verglichen. 20 Sekunden als Stoppzeit liegen deutlich unterhalb der theoretischen Inkubationszeit, wodurch sich ein Optimum der Inkubation besser am Signal ablesen lässt. Der Inkubationsbereich von 150 – 270 µl erbrachte hierbei für beide Inkubationszeiten (20s und 40s) jeweils die höchsten Intensitäten und ist somit das Optimum für einen Inkubationsbereich. In einer weiteren Testreihe konnte gezeigt werden, dass ohne weiteren Signalverlust, aber verbunden mit einem erheblichen Zeitgewinn von acht Minuten die Inkubationsphase der Sonden auf zweimal 80 Sekunden nach 210 µl und 220 µl gefördertem Volumen reduziert werden kann. Das liegt hauptsächlich an der Tatsache, dass Detektionsantikörper bei nicht-kompetitiven Tests stark überschüssig vorhanden sind und somit die Reaktion schneller beendet ist. Folglich liegt die Inkubationsdauer der nicht-kompetitiven Sonden bei nur 160 Sekunden.

13.4 Durchführung von Immun-Tests

In den vorangegangen Kapiteln wurden einzelne fluidische Operationen verifiziert. In diesem Kapitel wird das Resultat des gesamten Prozesses eines Immun-Tests formuliert. Zusätzlich erklärt das „Schema Flussprinzip“ (Abb. 39) das Zusammenspiel der fluidischen Komponenten.

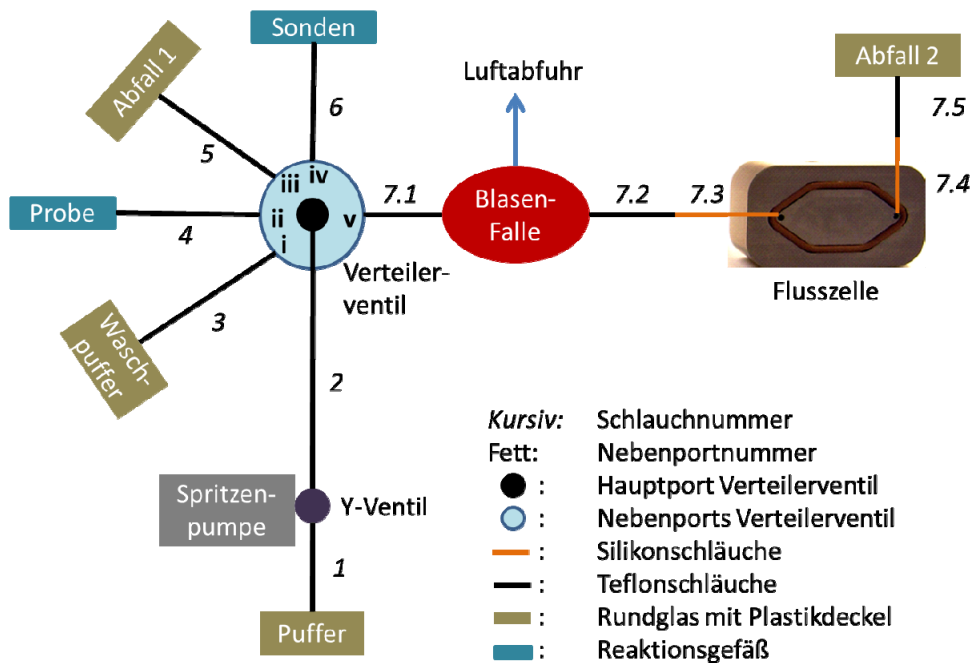


Abb. 39 Schema Flussprinzip

Schematische Darstellung der Komponenten und deren Verbindungen. Die schwarzen und braunen Verbindungen sind Teflon- bzw. Silikonschläuche. Als Gefäße kommen Rundgläser und Reaktionsgefäße zum Einsatz.

Das System arbeitet mit kostengünstigen Komponenten: Silikon- und Teflonschläuche (schwarze und braune Verbindungen), einem Verteilerventil, einer Spritzenpumpe mit Y-Ventil, einer Blasenfalle, einer Flusszelle und verschiedenen Flüssigkeitscontainern (Rundgläser und Reaktionsgefäße). Da die Anzahl der Komponenten gering ist und diese zum Großteil wieder verwendet werden können, ist das System kosteneffizient aufgebaut. Die Beschreibung der Komponenten ist in Kapitel 8.2 auf S. 57 zu finden.

Nach Abb. 39 werden die Teflonschläuche (Material: FEP, 0,8 mm Durchmesser) am Verteilerventil, an der Spritze und an der Blasenfalle mit Fittings der Fa. Hamilton befestigt, hierzu wird der Schlauch gebördelt. Somit ist das Y-Ventil der Spritzenpumpe mit dem Hauptport des Verteilerventils verbunden. Der Hauptport des Verteilerventils kann wahlweise mit einem Nebenport verbunden werden. Bei den rechteckigen Formen Sonde, Abfall 1, Probe, Puffer, Waschpuffer und Abfall 2 handelt es sich um Flüssigkeitscontainer. Für Abfall 1 und Abfall 2 werden leere Rundgläser (25 ml Volumen) mit Plastikdeckel verwendet. Der Schlauch wird durch ein Loch im Plastikdeckel geführt. In den Abfallbehältern werden während des Testablaufs oder bei Waschroutinen Flüssigkeitsüberstände gesammelt, welche nicht mehr benötigt werden und somit als Abfall gelten. Abfall 1 ist mit dem Nebenport iii verbunden, Abfall 2 ist mit der Flusszelle verbunden. Beim Puffer und Waschpuffer handelt es sich um mit Puffer gefüllte Rundgläser, bei denen der Schlauch wiederum durch ein Loch im Plastikdeckel geführt wird. Das Gefäß Puffer ist mit PBS gefüllt und mit dem zweiten Port des Y-Ventils verbun-

den. Das Gefäß Waschpuffer ist mit PBS mit 0,1% Tween 20 gefüllt und mit dem Nebenport i verbunden. Für die Proben werden Reaktionsgefäße mit 0,5 ml Volumen und für die Sonden werden Reaktionsgefäße mit 2 ml Volumen verwendet, welche mit dem Nebenport ii bzw. iv des Verteilventils verbunden werden. In den Gefäßen mit Sonden sind die Detektionsantikörper für nicht-kompetitive und Bindungsinhibitions-Tests gelöst und in den Gefäßen der Proben befindet sich die Flüssigkeit mit gelöstem Analyt, wie z. B. humanes Plasma. Auf der Flusszelle befinden sich Fittings der Fa. Lee vom Typ Ministac. Zum Verbinden der Flusszelle werden kurze Silikonschläuche verwendet, diese können sowohl über die Enden der Teflonschläuche als auch über die Fittings des Ministacs gestülpt werden. Da die Silikonschläuche elastisch sind, dichten diese die Verbindungen sehr gut ab und sie können manuell einfach gewechselt werden. Dies ermöglicht ein einfaches Entfernen der Flusszelle, die nach jeder Messung durch Abspülen mit DI-Wasser manuell gereinigt wird, um möglichen Verschleppungen der Analyten entgegen zu wirken. Zwischen der Flusszelle und dem Verteilerventil befindet sich die Blasenfalle an Nebenport v. In der Blasenfalle werden die Luftsegmente (siehe Kapitel 13.2) durch Luftabfuhr entfernt. In Tabelle 7 sind die Todvolumina der Schläuche in Mikroliter aufgeführt, die Schlauchnummerierung bezieht sich auf Abb. 39.

Tabelle 7 Todvolumen der Schläuche

Schlauchnummer	Todvolumen [µl]
1	150
2	270
3	135
4	75
5	90
6	130
7.1	110
7.2	25
7.3	20
7.4	30
7.5	120

Anhand der Ergebnisse aus Kapitel 13.1 “Multilamination und Dosierung“, 13.2 “Mischen durch Taylor-Dispersion“ und 13.3 „Einstellung der optimalen Inkubationsphase“ kann der Testablauf festgelegt werden. Im Folgenden versteht man unter Vorinkubation die Reaktion von Antigen und Antikörper in der Flüssigphase fern vom Chip, welche für den Bindungsinhibitions-Test essentiell ist. Als Inkubation wird die Reaktion der Moleküle in der Flusszelle bezeichnet. Die Durchführung des Immun-Tests hat folgenden Ablauf:

- Fluten aller Schläuche, bis auf den Abschnitt der Flusszelle mit Puffer (PBS). Am Ende der Schläuche für Probe und Sonden bleibt ein Luftsegment zurück.
- Einziehen von 10 µl Probe und 90 µl bindungsinhibitierende Sonden (gelöst in PBS:LowCross 5:1). Die Lösungen befinden sich nun mit einem Luftsegment abgetrennt vor dem Verteilerventil. Proben und Sonden werden vom Bediener des Systems zur Verfügung gestellt und nach der Eingabe entfernt.
- Diese Mischung ist durch Luftsegmente vom Systempuffer abgegrenzt.
- Mischen und Verdünnen der Sonden im Verhältnis 1:10 durch Multilamination. Das Verteilerventil alterniert sieben Mal, um drei Fluidsegmente Probe mit vier Fluidsegmenten Sonden zu erstellen. Die zwei trennenden Luftsegmente werden zu einem größeren Luftsegment zusammengebracht.
- Hinter den Sonden und der Probe wird Luft nachgezogen.
- Fünfmaliges Vor- und Rückwärtspumpen der Mischung mit 8,3 µl/s und anschließender Ruhezeit von 30 Sekunden.
- Diese Mischung ist nun von zwei Luftsegmenten umschlossen, vom Systempuffer abgegrenzt und homogen gemischt.
- Führung der Lösung durch die Blasenfalle in die Flusszelle mit 50 µl/s, die hintere Blase wird entfernt.
- Zehn Minuten Inkubation der Lösung in der Flusszelle auf dem Chip, zusammengesetzt aus 120 Sekunden Wartezeit mit jeweils fünfmaligem Nachführen von 10 µl der Mischung.
- Waschen mit 250 µl PBS 0,1% Tween 20.
- Zweimal Waschen mit 250 µl PBS.
- Messung: Signalaufnahme des Bindungsinhibitions-Tests.
- Einbringen von 100 µl der nicht-kompetitiven Sonden (gelöst in PBS:LowCross 5:1).
- Sonden wie oben durch Luftblasen getrennt.
- Pumpen der Sonden durch die Blasenfalle mit 2,1 µl/s, hierbei werden beide Blasen entfernt.
- Zweimal 80 Sekunden Inkubation der Sonden in der Flusszelle auf dem Chip mit jeweiligem Nachführen von 10 µl der Sonden.
- Waschen mit 250µl PBS 0,1% Tween 20.
- Zweimal Waschen mit 250 µl PBS.
- Messung: Signalaufnahme des nicht-kompetitiven Tests.

Das Resultat dieses Ablaufs ist die Durchführung des bindungsinhibitierenden und des nicht-kompetitiven Tests mit einer Verdünnung der Probe von 1:10.

14 Automatisierung des Messvorgangs

Im Kapitel 12 „Charakterisierung der Optik-Einheit“ konnte gezeigt werden, dass die Signalaufnahme der Mikroarrays von diagnostischen Immun-Tests über genügend Sensitivität, Dynamik und Reproduzierbarkeit verfügt. In Kapitel 13 „Fluidik-Einheit“ konnten alle nötigen fluidischen Funktionen für die Durchführung von Immun-Tests verifiziert werden und als Resultat der Ablauf für die Tests festgelegt werden. Ein komplettes POCT-System muss jedoch auch in der Lage sein, all diese Operationen vollautomatisiert zu prozessieren. Daher werden in die System-Software Befehle für die Steuerung der Komponenten des Systems implementiert. Der Befehlssatz ist in einer einfachen Programmiersprache verfasst, die im Folgenden als Skript bezeichnet wird. So können sehr einfach und flexibel unterschiedliche Abläufe der Messung oder der fluidischen Operationen erzeugt und gespeichert werden. Durch Verwendung identischer Skripts für die Immun-Tests kann so ein sehr hoher Grad an Reproduzierbarkeit und Automatisierung erreicht werden. Der Befehlssatz kann in einem Texteditor eingegeben und dann in die Software geladen werden. Das System arbeitet diese Befehle seriell ab. Alle möglichen Befehle sind in der folgenden Tabelle 8 aufgeführt und erklärt. Der Parameter „s“ ist stets 1, da nur eine Spritze verwendet wird.

Tabelle 8 Skript-Kommandos

Kommando	Beschreibung	Indizes
DISP s v x	Drücken von 'x' µl mit der Geschwindigkeit 'v'.	s = 1 [Spritzenanzahl] v = 1 - 60 [s/Vollhub] x = 1 - 250 [µl]
PICK s v x	Aufnehmen von 'x' µl mit der Geschwindigkeit 'v'.	s = 1 [Spritzenanzahl] v = 1 - 60 [s/Vollhub] x = 1 - 250 [µl]
FLUSH s v	Abgabe des gesamten vorhandenen Spritzenvolumens mit der Geschwindigkeit 'v'.	s = 1 [Spritzenanzahl] v = 1 - 60 [s/Vollhub]
FILL s v	Aufnahme des gesamten vorhandenen Spritzenvolumens mit der Geschwindigkeit 'v'.	s = 1 [Spritzenanzahl] v = 1 - 60 [s/Vollhub]
SETVALVE z	Bestimmung des Ports des Verteilerventils. Acht Zugänge wählbar.	z = 1 - 8
SYRPORT x	Bestimmung des Ports des Y-Ventils Ein- oder Ausgang.	x = 1 - 2
WAIT t	Wartet für 't' Sekunden zum nächsten Befehl.	t = 1 – 1000 [s]
DIAG b	Wertet das letzte aufgenommene Mikroarray Bild automatisch aus mit 'b' dem Namen des Ref-Files.	b = Name des Ref-Files
COUP	Koppelt den Laser automatisch in maximaler Intensität in den Chip ein.	-
MEAS a m r f i	Aufnahme von 'm' Fluoreszenzbildern mit um den Faktor 'f' gesteigerte Integrationszeit der Kamera mit automatischer Aufnahme des ersten Bildes im Modus 'a' mit der Intensität 'i'. Die Messung wird im Modus 'r' manuell oder automatisch gespeichert.	a = 1-3 m = 1-7 r = 1-2 f =1 -5 i = 1 – 100 [%]
DETFILTER k	Bewegt Interferenzfilter zwischen die Optik. Zwei Filter einsetzbar, eine Position ohne Filter.	k = 1 - 3

Wie in Tabelle 8 zu sehen, können die Befehle FILL, FLUSH, PICK, DISP, SYRPORT und SETVALVE alle aktiven Elemente der Fluidik steuern. Die Komponenten sind in Kapitel 8.2 und die Durchführung der Immun-Tests mit Funktionsschema der Fluidik in Kapitel 13.4 beschrieben.

Die Befehle der Optik-Einheit sind COUP, MEAS und DETFILTER. Die Komponenten der Optik-Einheit sind in Kapitel 8.1 beschrieben. Der COUP-Befehl gliedert sich folgendermaßen auf: Zunächst fährt der Interferenzfilter aus der Optik, der Laser wird mit 30% Leistung aktiviert, der steuerbare Einkoppelspiegel beginnt schrittweise den Einkoppelwinkel abzufahren, für jeden Schritt macht die Kamera eine Intensitätsaufnahme. Das schrittweise Abfahren geschieht in drei Stufen, bei der jeweils die Schritte um das gefundene Maximum verfeinert und so optimiert werden. Am Ende des Prozesses ist der Einkoppelwinkel des Lasers maximal. Der MEAS-Befehl arbeitet folgenderweise: Zunächst fährt der Interferenzfilter in die Optik, der Laser wird mit 100% Leistung ak-

tiviert. Die erste Integrationszeit wird automatisch gefunden, sie wird so lange nach oben gefahren, bis sich auf dem Bild ein Element mit 3x3 Pixel mit dem Grauwert 120 befindet. Dies ist die Basiszeit für die Messungen, welche um den Faktor „f“ mit jedem folgenden Bild erhöht wird. Die Anzahl der Bilder ist mit „m“ eingestellt. Die maximale Zeit begrenzt die Messung, sie ist auf 60 Sekunden eingestellt. Für jedes aufgenommene Bild wird der Dunkelstrom korrigiert. Hierzu wird der Laser abgeschaltet und in identischer Integrationszeit ein Bild aufgenommen, welches von dem Bild der Messung mit angeschaltetem Laser abgezogen wird. Somit lassen sich mit den Befehlen der Optik-Einheit vollautomatisch Fluoreszenzbilder aufnehmen und abspeichern. Mit dem Befehl DIAG kann die Messung direkt automatisch ausgewertet und gespeichert werden. Hierzu dient das „Ref-File“ als Grundlage. In dieser Datei sind Informationen zum Aufbau des Mikroarrays hinterlegt, wie z. B. Abmessungen des Arrays, Spot-Durchmesser, welcher Spot welchem Parameter entspricht, usw. Das Resultat ist, dass durch spezielle Algorithmen in der Software die Arrays automatisch als Objekt im Bild gefunden und, wie in Kapitel 12.3 „Bestimmung der Mikrospot-Intensität“ beschrieben, analysiert werden.

Zusammengefasst ist somit ein Gesamt-System entstanden, das in der Lage ist vollautomatisch Immun-Tests durchzuführen, die Signale eines Mikroarrays aufzunehmen und anschließend zu analysieren. Der gesamte Ablauf beträgt ab Eingabe der Probe 25 Minuten und läuft vollautomatisch ab. Ausnahme ist die Eingabe der Probe und Sonden, die vom Bediener des Geräts vollzogen wird. Somit sind die Grundvorrausetzungen für ein POCT-System erfüllt.

15 Multiparameter-Tests

15.1 Standardkurven in Serumersatz

Um das WLS mit klinischen Tests zu charakterisieren, werden Analyten als Standards in einen Serumersatz zugegeben. Nach Kapitel 3.4 „Analyse von Biochipsignalen“ werden so Standardkurven erzeugt, um Charakteristika wie das Detektionslimit LOD, Unpräzision und Unrichtigkeit zu ermitteln. Als Serumersatz wird PBS mit 4 % Humanalbumin (w/w), im Folgenden HSA genannt, verwendet. Bei 4 % entspricht dieser Anteil dem Hauptbestandteil von humanem Serum und kann somit als Ersatzmittel herangezogen werden, das keine Analyten beinhaltet. Die Chips sind (siehe Kapitel 7 „Herstellung von Biochips“) mit dem TopSpot hergestellt. Die Antigene für CRP, IL-6 und PCT werden der 4 % HSA Lösung in folgenden Konzentrationen zugegeben:

- CRP: 0 - 100 - 1 000 - 10 000 - 100 000 µg/l
- IL-6: 0 - 0,5 - 5 - 50 - 500 µg/l
- PCT: 0 - 0,5 - 5 - 50 - 500 µg/l

In Abb. 40 ist das Ergebnis der Messreihe zu sehen. Es ist vom Signalverlauf der Kurven ablesbar, dass der bindungsinhibitierende Test für CRP parallel mit den nicht-kompetitiven Tests für IL-6 und PCT prozessiert werden kann. Der immense Unterschied in den LOD zwischen den zwei Testformaten ist herausstechend.

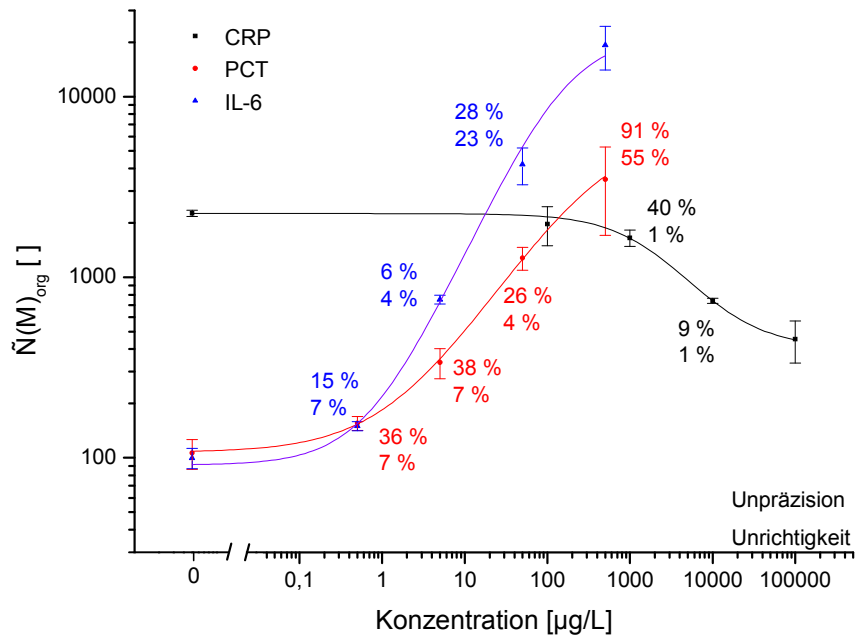


Abb. 40 Standardkurven in 4 % HSA

CRP als bindungsinhibitierender Test, IL-6 und PCT als nicht-kompetitiver Test. Spottingantigen CRP 200 mg/l, Spottingantikörper IL-6 und PCT 200 mg/l. Detektionsantikörper CRP 2 mg/l; IL-6 und PCT 1,1 mg/l.

Für CRP liegt der klinisch relevante Bereich bei 1000 -500 000 µg/l, der LOD der Kurve liegt bei 330 µg/l, der LLOQ bei 1990 µg/l. Dies wäre passend für den klinischen Bereich. Dies konnte durch die Verwendung einer hohen Konzentration von CRP Detektionsantikörper in Verbindung mit dem Bindungsinhibitions-Test erreicht werden [85]. In einem nicht-kompetitiven Testformat liegt der LOD für CRP bei 3,4 µg/l mit einem Faktor von ca. 110 niedriger [12].

Für IL-6 liegt der klinische Bereich bei 0,04 -1,5 µg/l und für PCT bei 0,05 - 50 µg/l, also sind hier niedrige Detektionslimits erwünscht. Erreicht wird ein LOD für IL-6 bei 0,4 µg/l, ein LOQ von 1 µg/l und für PCT ein LOD 0,7 µg/l bzw. LOQ 3,8 µg/l. Hier fehlt also ein Faktor von ca. 10, um den klinischen Bereich tatsächlich abdecken zu können. Dieser Faktor entspricht dem Verdünnungsfaktor des Systems. Könnte hier ohne Verdünnung gemessen werden, wäre das System in der Lage solche geringen Mengen zu detektieren. Limitierung ist hier also auch durch die Funktionalität der Antikörper auf Grund von Matrix-Effekten verursacht. Dennoch wäre es für PCT möglich mittlere und stark erhöhte Werte zu messen, für IL-6 hingegen nur stark erhöhte Werte.

Die Unrichtigkeit und Unpräzision im Graphen ist nur angegeben, wenn die Intensitätswerte der Einzelchips innerhalb der oberen bzw. unteren Sättigung liegen, also innerhalb des dynamischen Messbereichs. Die Untersuchung der Unrichtigkeit und der Unpräzision zeigt Folgendes: Im dynamischen Messbereich der Standkurve liegt IL-6 für die Replika bei 0,5 µg/l bei 15 % Unpräzision und 7 % Unrichtigkeit, bei 5 µg/l liegen diese bei 6 % und 4 %. Jedoch bei 50 µg/l sind diese mit 28 % und 23 % stark erhöht. Somit kann diese Standardkurve, wenn auch sehr knapp, nicht positiv validiert werden. CRP weist nur ein Replika bei 10 000 µg/l im dynamischen Bereich auf. Für eine Validierung sind das zu wenige Messpunkte im dynamischen Bereich, jedoch liegt dieses Replika mit 9 % Unpräzision und 1 % Unrichtigkeit sehr exakt. Für PCT konnte keines der Replika den Grenzwert von 15 % für Unpräzision unterschreiten.

15.2 Standardkurven in humanem Plasma

Für weitere Charakterisierung des WLS mit Standards für NPT, Il-6 und PCT wird die Kapazität des Systems in humanem Plasma ermittelt. Humanes Plasma ist für die Diagnostik von sehr hohem Interesse, da dies die eigentlich Matrix für die Durchführung von Tests in der Realität ist. Wie zuvor werden nach Kapitel 3.4 „Analyse von Biochipsignalen“ Standardkurven erzeugt. Die Chips sind nach Kapitel 7 „Herstellung von Biochips“ mit dem Spotter BioOdyssey Calligrapher Miniarrayer prozessiert. Da die Plasmaprobe bereits physiologische Konzentrationen der Analyten beinhalten, wurde mit klinisch etablierten Systemen sichergestellt, dass keine pathogen erhöhten Werte vorhanden sind (Siemens Advia 1650). Die zugegebenen Konzentrationen befinden sich deutlich über den physiologischen Werten, daher kann der Einfluss dieser Werte auf die Standardkurve vernachlässigt werden. Die Antigene für NPT, IL-6 und PCT werden in humanem Plasma in folgenden Konzentrationen zugegeben:

- NPT: 0 - 1 - 10 - 100 - 1000 µg/l
- IL-6: 0 - 0,5 - 5 - 50- 500 µg/l
- PCT: 0 - 0,5 - 5 - 50- 500 µg/l

In Abb. 41 a) und b) wird die Standardkurve identisch wiederholt.

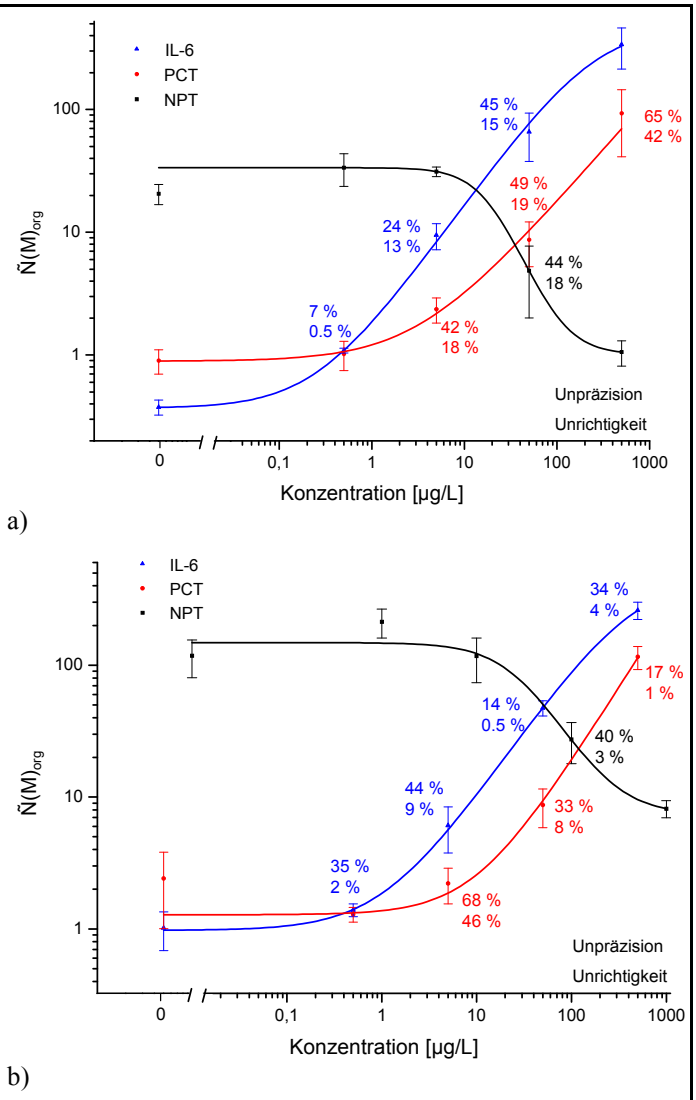


Abb. 41 Standardkurven in Plasma

a) und b): NPT als bindungsinhibitierender Test, IL-6 und PCT als nicht-kompetitiver Test. Spottingantigen NPT 200 mg/l, Spottingantikörper IL-6 und PCT 200 mg/l. Detektionsantikörper NPT 20 µg/l; IL-6 und PCT 1,1 mg/l.

IL-6 erfüllt die klinischen Anforderungen für die Replika bei 0,5 µg/l für Test a) und b). In Test a) ist der LOD mit 0,1 µg/l nah am klinisch relevanten Bereich, jedoch hat Test b) mit einem LOD von 1,1 µg/l eine verminderte Sensitivität.

PCT hat im Vergleich mit dem Test in Serumersatz einen stark erhöhten LOD mit 2,1 µg/l in Test a) und sogar 35 µg/l in Test b). Letzteres wird vor allem durch ein hohes und schwankendes Nullprobensignal verursacht. Der gesamte Kurven-verlauf der zwei Messungen ist jedoch sehr ähnlich.

NPT hat einen klinisch relevanten Bereich um 2,5 µg/l, der nicht aufgelöst werden kann. Jedoch ist eine gute Übereinstimmung der Kurven aus a) und b) zu sehen, abgesehen vom Versatz der Kurven liegt der dynamische Messbereich zwischen ca. 10-300 µg/l. Die Präzision ist ungenügend, im linearen Bereich von Test a) mit 44% und Test b) mit 44%.

Da für eine vollständige Validierung die oberen und unteren Sättigungsbereiche abgedeckt und innerhalb des dynamischen Messbereichs mehr Messpunkte sein sollten, wird der Versuch aus Abb. 41 mit einer höher aufgelöster Konzentrationsreihe in Plasma angesetzt mit:

- NPT: 0 - 0,1 -12,15 - 40,5 - 135 - 450 - 1500 - 5000 - 50000 µg/l
- IL-6: 0 - 0,73 - 2,43 - 8,1 - 27 - 90 - 300 - 3000 µg/l
- PCT: 0 -2,43 - 8,1 - 27 - 90 - 300 - 1000 - 10000 µg/l

Die Standardkurve von IL-6 in Abb. 42 ergab einen LOD von 0,7 µg/l und einen LLOQ von 1,5 µg/l. Vor allem die Unpräzision ist erhöht, nur das Replikat bei 27 µg/l liegt unterhalb der 15 %-Grenze. Für die Replikate bei 2,43 µg/l und 8,1 µg/l ist die Unrichtigkeit mit 35 % bzw. 43 % stark erhöht. Generell scheint die Funktionalität des Tests durchaus gegeben, die Qualität der Standardkurve ist durchaus mit denen der vorangegangen Kurven vergleichbar.

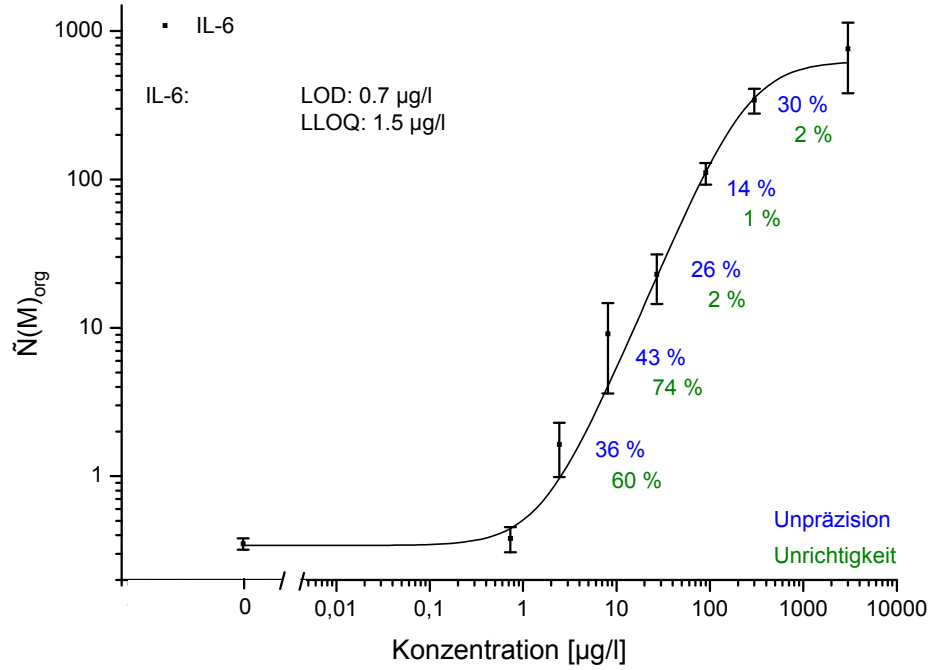


Abb. 42 Standardkurven in Plasma: IL-6

NPT als bindungsinhibitierender Test, IL-6 und PCT als nicht-kompetitiver Test. Spottingantigen NPT 200 mg/l, Spottingantikörper IL-6 und PCT 200 mg/l. Detektionsantikörper NPT 20 µg/l; IL-6 und PCT 1,1 mg/l.

In Abb. 43 sind die Standardkurven von PCT in a) und NPT in b) gezeigt. Die Unrichtigkeit liegt im Mittel durchweg unterhalb der 15 %-Grenze, jedoch weisen die Werte für die Unpräzision wiederum stark erhöhte Werte auf, hiervon liegen die meisten Replika über einen Faktor 2 von der 15 %-Grenze entfernt. Die Funktionalität des Tests ist jedoch gegeben. Der LOD und LLOQ ist mit 25 µg/l bzw. 46 µg/l sehr stark erhöht. Die Gründe hierfür konnten nicht exakt ermittelt werden, ein Fehler bei der Probenvorbereitung scheint in diesem Fall jedoch nicht unwahrscheinlich, da sonst des Öfteren ein 10-fach geringeres Detektionslimit für diesen Parameter erreicht wurde. Dieser Fehler wird im weiteren Verlauf noch beschrieben. Für NPT konnte die Qualität der vorangegangen Standardkurven nicht erreicht werden. Die Kurve ist sehr inkonsistent, der Datensatz wird aus diesem Grund nicht gefittet. Allein der Signalverlauf ist für einen bindungsinhibitierenden Test korrekt, wenn auch das Nullsignal auffällig niedrig ist. Dieser Effekt wurde vermutlich mitunter durch ein inhomogenes Spotting verursacht.

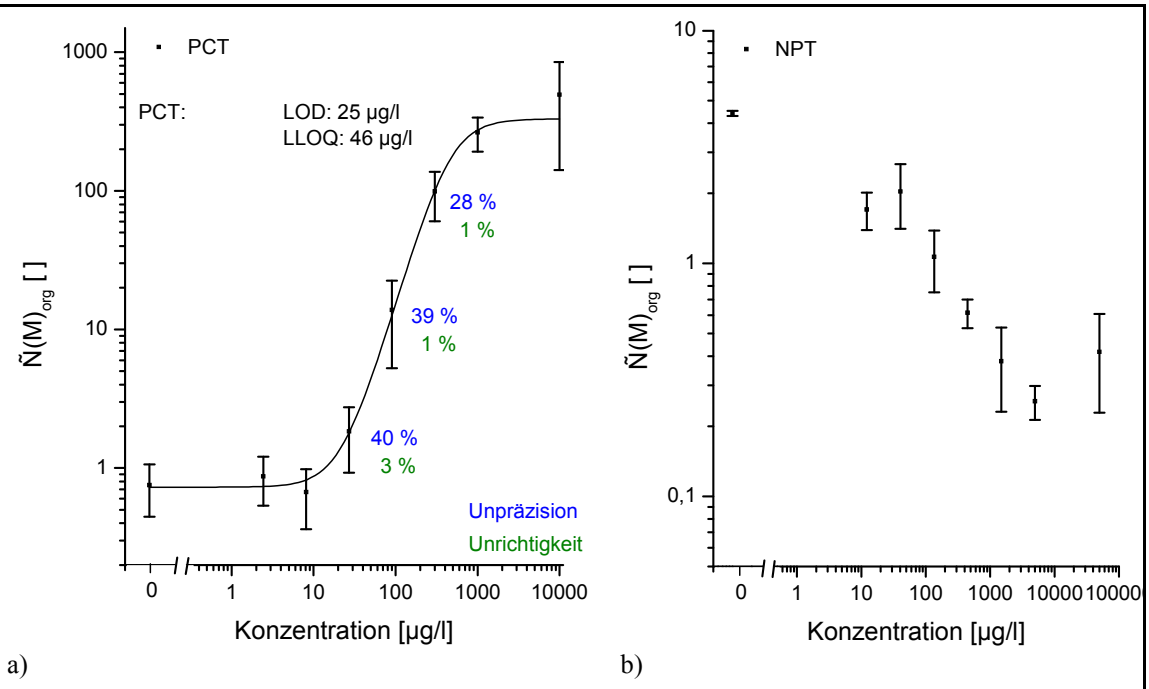


Abb. 43 Standardkurven in Plasma: a) PCT und b) NPT

NPT als bindungsinhibitierender Test, IL-6 und PCT als nicht-kompetitiver Test. Spottingantigen NPT 200 mg/l, Spottingantikörper IL-6 und PCT 200 mg/l. Detektionsantikörper NPT 20 µg/l; IL-6 und PCT 1,1 mg/l.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die zwei Testformate und die Parameter prinzipiell zusammen in humanem Plasma prozessiert werden können. Der IL-6 Test ist in der Lage stark erhöhte und der PCT Test mittel bis stark erhöhte Werte zu detektieren. Die klinischen Anforderungen bezüglich Unpräzision und Ungenauigkeit können nicht erfüllt werden. Besonderes NPT zeigt hier hohe Variationen auf. Die Chips der zwei prozessierten Messreihen des Tests in Abb. 41 a) und Test b) zeigen zusätzlich starke Variationen auf, d. h. die Qualität eines Chipsatzes differiert zu einem identisch prozessierten Chipsatz noch zu stark. Der groß angesetzte Multiparameter-Test aus Abb. 42 und Abb. 43 bestätigt diese Aussagen.

16 Fehlerquellen für das Wellenleitersystem

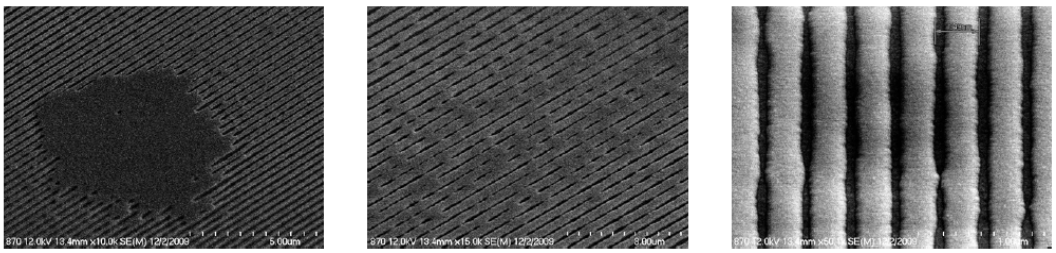
Neben dem Beweis für die Funktionalität der Fluidik mit Immun-Tests in automatischer Durchführung mit Multiparameter-Tests aus Kapitel 15 wurde eine ungenügende Reproduzierbarkeit der Standardkurven festgestellt. Daher sollen in diesem Kapitel die Fehlerquellen, die diese Schwankungen verursachen, untersucht werden. In Tabelle 9 sind theoretisch mögliche Fehlerquellen, Ursachen und die Auswirkungen auf das Messsignal im WLS aufgelistet. Oft weisen die Fehler unterschiedliche Ursachen, aber dennoch gleiche Auswirkungen auf. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass viele dieser Fehler im System auftreten und somit im Testsignal überlagert enthalten sind.

Tabelle 9 Fehlerquellen und Auswirkung

Prozess	Quelle	Ursache	Auswirkung
Chippräperation	Wellenleiter-chip	Gitterfehler	Ungleichmäßige Einkopplung, dadurch inhomogene Ausleuchtung
		Schwankungen der Dicke der Wellenleiterschicht	Variierendes evaneszentes Feld, unterschiedliche Intensitäten
		Dämpfung in Lichtaus-breitungsrichtung	Abnahme der Anregung mit dem Abstand zum Einkoppelgitter
		Fremdkörper Verschmutzung	Absorption, Streuung, dadurch Verringerung der Anregungsintensität
	Reinigung und Be-schichtung	Schwankungen der Schichtdicke	Variierendes evaneszentes Feld, unterschiedliche Intensitäten
		Inhomogene Schicht durch Fabrikationsfehler	Inhomogene Schichtdicke, dadurch Variation der Anregungsintensität
		Funktionalität der Ober-flächenchemie	Mangelhafte Immobilisierung der Biomoleküle
	Spotting	Temperatur	Änderung der Viskosität der Spottingsubstanzen
		Luftfeuchtigkeit	Verdunstung, dadurch unterschiedliche Spotgrößen
		Anreicherung	Mit dem Verlauf des Spottings ansteigende Spotintensitäten
		Nadelhub	Unterschiedliche Morphologien, Signal-verlauf
		Spottingpuffer mit Additiven	Direkter Einfluss auf Morphologie und Funktionalität
Assay	Fluidik-Einheit	Mischen, Verdünnen	Schwankungen der Konzentrationen bei der Inkubation
		Blasenfalle	Blasen stören Inkubation
		Höhe der Flusszelle	Variation beim Anpressen, Diffusions-länge variiert
		Verschleppung	Beeinflussung der Signalstärke einer anderen Analytkonzentration
	Optik-Einheit	Einkoppelwinkel	Direkte Beeinflussung der Intensität der Anregung
		Schwankungen der Laserleistung	Direkte Beeinflussung der Intensität der Anregung
		Justage der Trägerfläche	Direkte Beeinflussung der Intensität der Anregung, ungleichmäßige Einkopplung
		Signalauswertung	Signalverfälschung durch Artefakte
	Reaktionen und Biochemie	Temperatur	Beeinflussung der Reaktionskinetik und Fluoreszenzintensität
		Puffer und Pufferzusätze	Direkte Beeinflussung der Reaktion

16.1 Wellenleiterchip

Eine interne Qualitätskontrolle der Wellenleiterchips vor der Prozessierung zum Biochip weist im Schnitt Abweichungen für einen Batch von 50 Chips bei Messungen für den Wert „mean excitation" 15 % Variation auf. Bei dieser Messung handelt es sich um einen kamerabasierten Aufbau, der die mittlere Intensität der Ausleuchtung der Wellenleitung bestimmt. Die Messung wird vom Hersteller der Wellenleiterchips vollzogen. Es ist fraglich, inwieweit die Messung von Streulichtintensitäten mit der Intensität des evaneszenten Felds zusammenhängt, jedoch scheint eine proportionale Korrelation nicht unwahrscheinlich. Verschmutzungen verfälschen aber diese Gegebenheit. Zusätzlich wurden durch Untersuchungen der optischen Gitter der Chips mit einem Rasterelektronenmikroskop Fehler erkannt, wie in Abb. 44 zu sehen [83].



a) b) c)

Abb. 44 Gitterstruktur im Rasterelektronenmikroskop [83]
a) Auflösung 10k, Loch im Gitter verhindert lokal effektive Einkopplung
b) Auflösung 15k, Inhomogenitäten im Gitter verhindern global effektive Einkopplung
c) Auflösung 50k, Inhomogenitäten im Gitter verhindern effektive Einkopplung

In Abb. 44 sind Inhomogenitäten des optischen Gitters der Chips festgehalten. Diese können die Effizienz der Einkopplung lokal in a) und global in b) und wiederum lokal c) stören, was insgesamt zu Schwankungen des evaneszenten Felds führt.

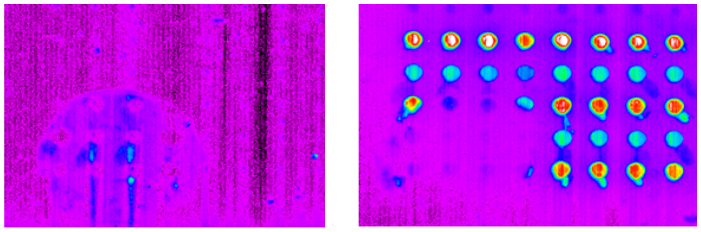
Zusammengefasst ist der Wellenleiterchip auch bereits vor der Prozessierung zum Biochip eine Fehlerquelle. Die interne Qualitätskontrolle zeigt einen Fehler der mittleren Ausleuchtung von 15 %. Diese kann durch die gezeigten Gitterfehler oder leichte Variationen in den Schichtdicken des Tantalpentoxids herrühren. Qualitativ stark minderwertige Chips können somit vor der Prozessierung zum Biochip als Ausschuss erkannt werden. Auf die Qualität der Wellenleiterchips selbst kann jedoch keinen Einfluss genommen werden, somit können diese Varianzen nicht aktiv optimiert werden.

16.2 Fluidik-Einheit

In Kapitel 13 ist gezeigt, dass das Fluidik-System akkurat mischt, verdünnt, dosiert und inkubiert. Die Fehlerquellen im System sind durch den Benutzer bedingt. Z. B. Schwankungen der Flusszellhöhe, beschrieben in Abb. 25 auf Seite 58, beeinflussen das Test-Signal. Die Zellhöhe nimmt entscheidend Einfluss auf die Inkubationszeit, wie in

Kapitel 4.6.1 in Gleichung 24 gezeigt. Die Zellhöhe beim korrekten Anpressen beträgt 30 µm, was einer Inkubationszeit eines Antikörpers mit der Diffusionskonstante 5E -11 m^2/s bei Raumtemperatur von 39,7 Sekunden entspricht. Bei 60 µm Zellhöhe beträgt diese Zeit bereits 158 Sekunden. Die Inkubationszeit der Probe im System ist auf 120 Sekunden eingestellt, somit werden Variationen von 30 µm + ca. 20 µm entgegenwirkt, wenn auch das Zellvolumen zunimmt. Dennoch kann durch den Bediener die Zellhöhe durch schwaches Anpressen stark erhöht werden, was zu fehlerhaften Messsignalen beiträgt.

Eine weitere Fehlerquelle der Fluidik ist die Blasenfalle, beschrieben in Kapitel 8.2 auf Seite 57. Die Membran zum Ausfiltern der Luft altert und muss daher in bestimmten Abständen gewechselt werden, zudem tritt fehlerhaftes Filtern auch statistisch auf. Daher ist die Blasenfalle nicht immer in der Lage die Luftsegmente zum Trennen der Probe und Sonden vom System-Puffer (Kapitel 13.4, S. 79) komplett zu entfernen. In diesem Fall gelangen Luftblasen in die Flusszelle, die die Reaktion erheblich stören können. In Abb. 45 ist ein solcher Fall gezeigt:



a) b)

Abb. 45 Luftblase in der Flusszelle
a) Auslesebereich im Streulichtbild
b) Auslesebereich der Fluoreszenz nach der Reaktion

In Abb. 45 a) lässt sich im Streulichtbild deutlich erkennen, an welcher Stelle sich die Luftblase festgesetzt hat. Abb. 45 b) zeigt klar, dass die Blase über den Mikrospots die Reaktion verhindert. Durch Aufnahmen von Streulichtbildern während der Inkubationsphase von Probe und Sonden wird der Zustand der Flusszelle ständig überwacht. Generell sollten Messungen mit Luftblasen verworfen werden, auch wenn sich der Fehler wie in Abb. 45 nur lokal auf die Position der Blase beschränkt. Luftblasen behindern die laminare Strömung und somit kann ein korrekter Ablauf des Immun-Tests nicht mehr gewährleistet werden. Die Aufnahme von Streulichtbildern halten solche fehlerhaften Messungen fest und können somit verworfen werden. Insgesamt ist der Fehlereinfluss von Luftblasen als sehr hoch einzuschätzen, dies kann aber durch das System erkannt werden, was so die Aufnahme von fehlerhaften Reaktionen verhindert.

16.3 Reaktion und Biochemie

Der Einfluss von Substanzen wie z. B. den Puffern für Spotting und Immun-Test, auf die Antikörper und Antigene ist offensichtlich. In [25] sind diese Effekte auf der in dieser Arbeit verwendeten Oberflächenchemie gezeigt.

No additive 1	No additive 1	No additive 1	No additive 1
SDS 0.6 (CV 38%)	No probe No additive	Triton X-100 0.2 (CV 75%)	TMA 1.3 (CV 61%)
CHAPS/form 0.1 (CV 50%)	CTAB 0.7 (CV 47%)	CHAPS 0.2 (CV 33%)	MCT 2.1 (CV 26%)

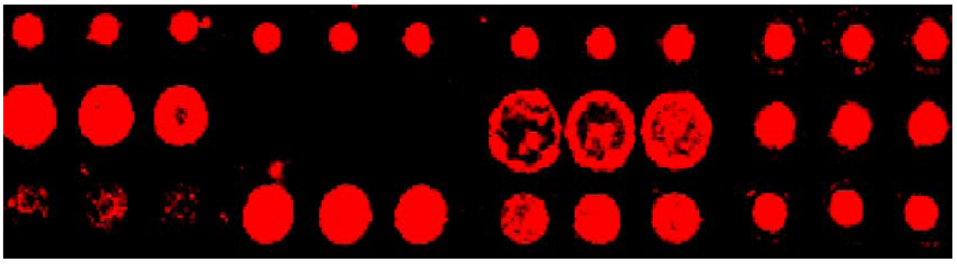


Abb. 46 Veranschaulichung: Einfluss von Additiven im Spottingpuffer [25]

Überblick von Additiven im Spotting-Puffer, wie z. B. SDS, CHAPS, TRITON als Zusatz mit 0,01 % (v/v). Der Einfluss von Additiven wirkt sich direkt auf die Spotmorpholgie, die Intensität und die Reproduzierbarkeit aus.

In Abb. 46 sind verschiedene Zusätze mit 0,01 % (v/v) von z. B. CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate) gezeigt, die mit einem DNA-Test mit einem kontaktlosen Spotter aufgebracht wurden. Auf die speziellen Zusätze und ihre Auswirkung soll hier nicht eingegangen werden. Gezeigt werden soll, dass Additive auf Puffer immense Auswirkungen auf den Mikrospot in Intensität, Reproduzierbarkeit und Morphologie aufweisen. Auch die Funktionalität von Immun-Tests kann stark von Additiven beeinflusst werden. In [25] wurde der Einfluss auch auf Basis von Protein Arrays mit verschiedenen Spottern untersucht, hierbei wurde eine ähnlich gravierende Auswirkung wie in Abb. 46 ermittelt. Ebenso der Zusatz von dem verwendeten Spottingpuffer in dieser Arbeit mit 0,001 % Natriumdeoxycholat in 1x PBS hat solche Einflüsse, wie auch der Test-Puffer mit 5:1 PBS- zu LowCross-Puffer Einfluss auf den Immun-Test nimmt.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass Puffer und deren Additive, egal ob beim Spotting oder im Immun-Test selbst, das Testergebnis beeinflussen. Bei fehlerhafter Vorbereitung dieser Puffer, Verunreinigungen oder Alterung ist es naheliegend, dass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse darunter leidet. Die Auswirkungen eines solchen Fehlers sind sehr schwierig quantitativ zu bestimmen.

Ein weiterer Punkt ist die Temperatur während des Immun-Tests. Die Temperatur nimmt sowohl auf die Fluoreszenzintensität Einfluss, als auch auf die Reaktionskinetik. Je wärmer fluoreszierende Spots werden, desto mehr Energie wird durch innere Umwandlung umgesetzt, also strahlungsfrei abgeben (vgl. Kapitel 4.1 „Fluoreszenz“). Folglich nimmt die Fluoreszenzintensität ab. Nach der Reaktions-Geschwindigkeits-Temperatur-Regel nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Temperatur

jedoch zu. Zusammengefasst können stark schwankende Temperaturen während einer Testreihe die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinflussen. Da die gezeigten Ergebnisse unter Raumtemperatur ablaufen, spielt dieser Effekt innerhalb einer Messreihe eine untergeordnete Rolle. Der Vergleich von Messungen in nicht klimatisierten Laboren z. B. im Winter und im Sommer könnte allerdings Abweichungen zeigen.

Untersuchungen der Emissionsspektren von fluoreszierenden Farbstoffen zeigten Änderungen beim Austrocknen der Farbstoffe auf. In Abb. 47 ist dieser Effekt an einem Fluoreszenzmikroskop von Leica DMIRE2 festgehalten. Hierzu wird in a) der Farbstoff Alexa 700 in Tropfenform auf einem mit Epoxid beschichteten Objektträger pipettiert, in b) ist der Tropfen eingetrocknet. Dargestellt ist das Emissionsspektrum bei 636 nm.

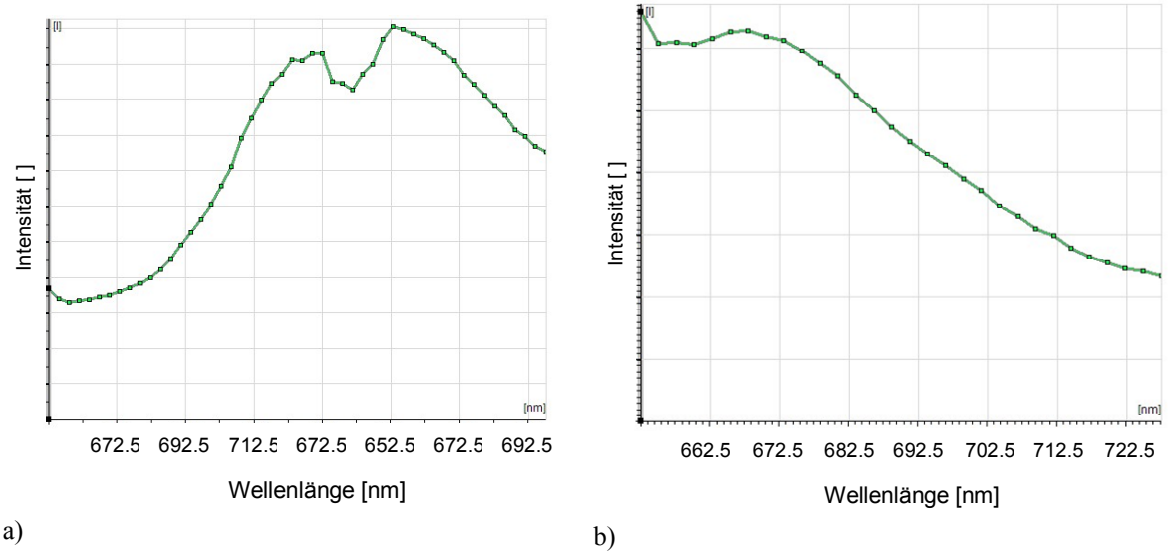


Abb. 47 Verschiebung des Emissionsspektrums durch Austrocknen des Farbstoffs

Im Fluoreszenzmikroskop Leica DMIRE2 konnten die Emissionsspektren bei der Anregungswellenlänge $\lambda = 636$ nm aufgenommen werden. In a) im Emissionsbereich von 652-692 nm mit flüssigen und b) von 652-722 nm mit eingetrocknetem Farbstoff Alexa 700 in PBS festgehalten werden. Hierbei ist eine deutliche Verschiebung des eingetrockneten Spektrums in niedrigere Wellenlängen zu erkennen.

Die Aufnahme der Spektren in diesem Mikroskop ist nicht exakt, jedoch lassen sich relative Veränderungen im Spektrum sehr gut vergleichen, außerdem konnten keine trockenen Proben in einem Spektrometer gemessen werden, da hier die Signale zu gering waren. Im Spektrum ist eine deutliche Verschiebung des Spektrums von Abb. 47 a) nach b) hin zu niedrigeren Wellenlängen zu beobachten. Dieser Effekt führt bei der optischen Detektion zu schweren Fehlern, da durch die Verschiebung der Spektren eine Veränderung der Intensität in den optischen Kanälen entsteht. Diese Tatsache verhindert jede mögliche Art einer exakten quantitativen Messung. Dies betrifft auch den für die Immun-Tests verwendeten Farbstoff Dy 647. Folglich dürfen Farbstoffe während der Signalentstehung und -erfassung nicht austrocknen. Im System werden die Farbstoffe im Puffer geführt und sind somit immer in flüssiger Phase.

17 Referenzierung für das Wellenleitersystem

In den Erläuterungen der Kapitel der theoretischen Grundlagen können eine Vielzahl von möglichen Fehlerquellen festgehalten werden, die das Test-Signal verfälschen können. Trotz der intensiven Optimierung in der Chipherstellung (siehe Kapitel 11 „Herstellung von Biochips“) zeigten die Ergebnisse des Kapitels 15 „Multiparameter-Tests“ mitunter die Limitierungen in Bezug auf die Diagnose von Sepsis auf, wie z. B. die nicht ausreichende Unrichtigkeit und vor allem die inakzeptable Unpräzision. Im Kapitel 16 „Fehlerquellen für das Wellenleitersystem“ wurden mögliche Ursachen für diese Schwankungen genau erklärt. Als Resultat dieser Untersuchungen werden weitere Methoden benötigt, damit die Ergebnisse des WLS akkurat werden. Als Lösungsansatz dient eine parallel zum Immun-Test durchgeführte Referenzreaktion. Hierzu wird durch die Verwendung von Antikörpern für die Referenzreaktion auf Äquivalente zum Immun-Test zurückgegriffen. Somit entsteht ein sehr hoher Übereinstimmungsgrad, z. B. gleicher Spottingpuffer, parallele Prozessierung und Immunglobuline G als Spotting- und Detektionsantikörper usw. Dadurch hat die Referenzierung das Potential, die Reproduzierbarkeit zu verbessern. In diesem Kapitel werden daher die Reaktion und deren Signalaufnahme als Prozess erklärt, sowie die Berechnungen zur möglichen Korrektur von Fehlern durch die Referenz. Hierbei werden drei verschiedene Methoden auf dieser Basis getestet, die theoretisch das Potential zur Verbesserung der Daten mit sich bringen.

17.1 Reaktion und Signalaufnahme

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Test-Ergebnisse bezüglich der Unpräzision und Unrichtigkeit werden verschiedene Referenz-Verfahren untersucht. Als Grundlage dient ein direkter Test (siehe Kapitel 3.5.3). Somit wird ein Spotting-Referenzantikörper (R) auf dem Chip immobilisiert. Der in Lösung befindliche Referenz-Detektionsantikörper (R*), welcher der Probe zugesetzt ist, ist in der Lage mit dem R zu reagieren. Hierbei ist das Paratop auf R* und das Epitop auf R. Als AK werden die immobilisieren Antikörper AK zum Binden der Antigene AG und dem Detektionsantikörper AK* bezeichnet. Dieses Grundprinzip kann unterschiedlich aufgebaut werden.

1 Homogene Referenzierung:
   a) Einkanalig:
      Hierbei ist R mit den AK vor dem Spotting vorgemischt. Der Farbstoff von R* ist identisch zu dem von AK* (Dy647).
   b) Zweikanalig:
      Hierbei ist R mit den AK vor dem Spotting vorgemischt. Der Farbstoff von R* strahlt in höherer Wellenlänge zu AK* (Dy647) ab. Hierfür wird für die Detektion ein zweiter Interferenzfilter in den optischen Kanal platziert.

2 Heterogene Referenzierung:
Hierbei befinden sich die Spotting-Referenzantikörper R benachbart zu den Spottingantikörpern der Analyten AK. Der Farbstoff des Referenz-Detektionsantikörper ist identisch zu dem der Detektionsantikörper der Analyten AK* (Dy647).

In Abb. 48 ist das Prinzip der heterogenen und homogenen Referenzierung schematisch dargestellt. In beiden Fällen wird der Referenz-Detektionsantikörper in konstanter Konzentration der Probe zugegeben. So inkubieren die Referenz-Detektionsantikörper zusammen mit den Antigenen der Probe auf dem Chip. Dabei entsteht ein Signal, das bei einem theoretisch absolut fehlerfreien System ein konstantes Signal entstehen lässt. Das Signal hätte 0 % Abweichung für Unpräzision und Unrichtigkeit (siehe Kapitel 3.4 „Analyse von Biochipsignalen“). In der Praxis fließt jedoch eine Vielzahl von Fehlern in das Signal von Mikrospots ein, die durch diese Referenzreaktion aufgelöst werden sollen. Die möglichen Fehler sind detailliert in Kapitel 14 „Referenzierung für das Wellenleitersystem“ beschrieben.

Als Spotting-Referenzantikörper dient für alle drei Verfahren der polyklonale IgG von Hasen (Invitrogen, No. 10500C), als Referenz-Detektionsantikörper für heterogene und einkanalige homogene Referenzierung der Antikörper Alexa Fluor 647 Ziege Anti-Hase IgG (Invitrogen, No. A-21245). Für die zweikanalige homogene Referenzierung wird der Antikörper Alexa Fluor® 700 Ziege anti-Hase IgG (Invitrogen, No. A-21038) verwendet.

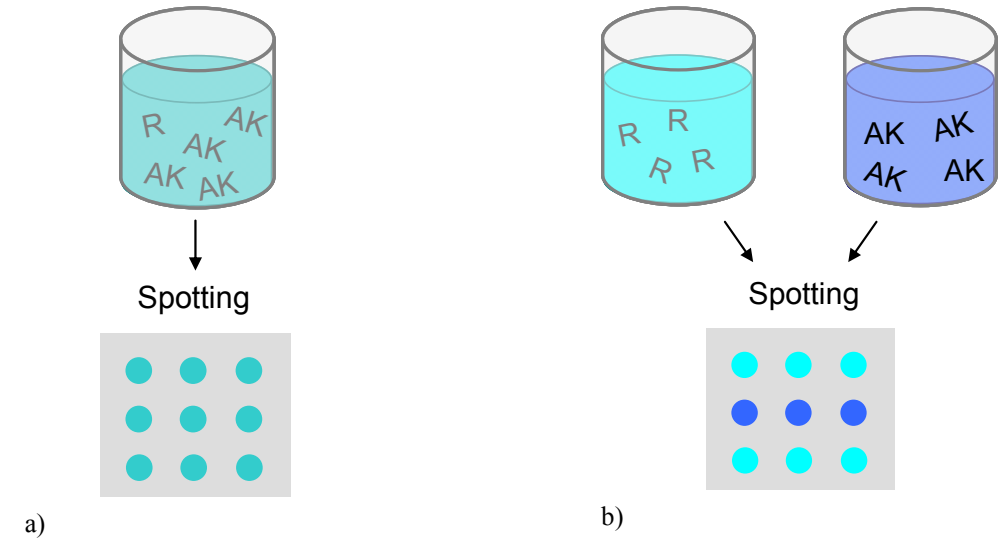


Abb. 48 Schema Referenz-Methoden
a) Homogene Referenzierung, b) Heterogene Referenzierung
Als „R“ sind Spotting-Referenzantikörper (polyklonale IgG von Hasen) und als „AK“ Spottingantikörper zur Detektion von Antigenen der Probe bezeichnet.

In Abb. 48 a) ist für die homogene Referenzierung zu sehen, dass die Spotting-Referenzantikörper den Spottingantikörpern der Analyten beigemischt werden. Dies geschieht in einem bestimmten Verhältnis für R:AK. Für die heterogene Referenzierung

sind R und AK voneinander getrennt, werden aber benachbart zueinander auf den Chip aufgebracht. Die Referenz-Spots sind so jeweils oben und unten um einen Mess-Spot in einer Konzentration von 85 mg/l angeordnet. Die Detektions-Referenzantikörper sind der Probe beigemischt. Daher ergibt sich folgender Ablauf des Tests:

- Mischen der Probe mit enthaltenen AG mit Anwesenheit von R* und AK* für bindungsinhibitierende Tests im Verhältnis 1:10. Homogene Referenzierung funktioniert für bindungsinhibitierende Tests nicht.
- Inkubation der Lösung auf dem Chip.
- Erfassung der Signale des bindungsinhibitierenden Tests und der Referenzreaktion, für heterogene und einkanalige homogene Referenzierung mit dem Interferenzfilter dem HQ 667/30, für zweikanalige homogene Referenzierung mit dem Interferenzfilter 720/30.
- Inkubation der AK* für nicht-kompetitive Tests.
- Aufnahme der Signale mit dem Interferenzfilter dem HQ 667/30.

17.2 Berechnung heterogene Referenzierung

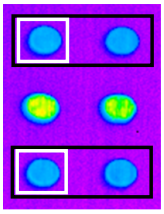


Abb. 49 Schema Referenzierung

Anordnung der Referenz- N(ref) und Mess-Spots N(M) für heterogene Referenzierung. Die N(ref) im weißen Kasten korrigieren mit dem dazwischen befindlichen N(M). Die N(ref) werden hierzu über die Zeile (schwarzer Kasten) verrechnet.

Um die Signale der eigentlichen Testmessung mit den entstehenden Signalen der Referenzreaktion (Kapitel 17.1) zu referenzieren, werden verschiedene Berechnungen unternommen. Die Signale der verschiedenen Referenz- und Mess-Spots N(M) und $N(ref)_{O,U}$ werden, wie später in Kapitel 12.3 „Bestimmung der Mikrospot-Intensität“ beschrieben, erfasst. Ziel hierbei ist es, die Referenz-Spots oben $N(ref)_O$ und die Referenz-Spots unten $N(ref)_U$ mit den Mess-Spots N(M) so zu verrechnen, dass im ersten Schritt Fehler von Spot-zu-Spot ausgeglichen und im zweiten Schritt Fehler von Chip-zu-Chip durch Referenzierung ausgeglichen werden. Über die Intensitäten der Referenz-Spot-Paare einer Zeile wird der Median gebildet (siehe Abb. 49, schwarzer Kasten) und durch den Mittelwert der einzelnen Referenz-Spot-Paare $N(ref)_O$ und $N(ref)_U$ (siehe Abb. 49, weißer Kasten) dividiert. Die in einem Array aufgebrachten Mess-Spots werden so durch Bildung eines Quotienten referenziert. Somit wird im späteren Verlauf je ein Mess-Spot mit einem gemittelten Referenzwert verrechnet. Diese Berechnung gleicht die für Wellenleiterleiterchips typische Dämpfung in Lichtausbreitungsrichtung und Einkoppelfehler in lateraler Richtung aus:

Gleichung 33 Korrektur von Spot-zu-Spot-Variationen

$$N(M)_{korr} = N(M) \cdot \frac{\widetilde{N}(ref)}{\left(\frac{N(ref)_O + N(ref)_U}{2}\right)}$$

mit

$$\widetilde{N}(ref) = \begin{cases} N(ref)_{\frac{n+1}{2}} & n \text{ ungerade} \\ \frac{1}{2}\left(N(ref)_{\frac{n}{2}} + N(ref)_{\frac{n}{2}+1}\right) & n \text{ gerade} \end{cases}$$

$N(M)_{korr}$ = Korrigierte Intensität der Mess-Spots

$\widetilde{N}(ref)$ = Median der Intensitäten der Referenz-Spots

$N(M)$ = Mess-Spot

$N(ref)_O$ = Intensität des oberen Referenz-Spots

$N(ref)_U$ = Intensität des unteren Referenz-Spots

n = Anzahl der Spots pro Zeile

Die korrigierten Mess-Spots $N(M)_{korr}$ geben nun die Intensitäten eines Mikroarrays wieder, deren Fehler für Variationen von Spot-zu-Spot minimiert sind. Im nächsten Schritt können die Spotreplika zusammengefasst werden, um einen Intensitätswert des Chips auszugeben:

Gleichung 34 Intensitätswert eines Chips

$$\widetilde{N}(M)_{korr,org} = \begin{cases} N(M)_{korr,org\frac{n+1}{2}} & n \text{ ungerade} \\ \frac{1}{2}\left(N(M)_{korr,org\frac{n}{2}} + N(M)_{korr,corr\frac{n}{2}+1}\right) & n \text{ gerade} \end{cases}$$

$\widetilde{N}(M)_x$ = Median der Intensitätswerte der Mess-Spots auf einem Chip, korrigiert oder original

$N(M)_x$ = Intensitätswert eines Mess-Spots

n = Anzahl Mess-Spots

Gleichung 34 ergibt den Median $\widetilde{N}(M)_x$ den zusammengefassten Intensitätswert eines Chips. $\widetilde{N}(M)_{korr}$ ist somit der zusammengefasste und von Spot-zu-Spot korrigierte Intensitätswert eines Chips für alle Mess-Spots mit identischen Analyten, $\widetilde{N}(M)_{org}$ ist der zusammengefasste Intensitätswert für die originalen Intensitätswerte der Mess-Spots. Da für gewöhnlich mehrere Messungen vollzogen werden, spielt die Abweichung der Variationen von Chip-zu-Chip eine große Rolle. Für diese Zwecke kann das Referenzsignal des Chips wiederum die Intensität eines Chips zu $\widetilde{N}_{korr}(M)_{korr}$ korrigieren. Hierzu wird der Median der Mess-Spot-Replikate $\widetilde{N}(M)_{korr}$ auf den Median aller sich im Chip befindlichen Referenz-Spots $\widetilde{N}(ref)$ durch Bildung des Quotienten mit einer Konstanten $const$ referenziert. Durch diese Berechnung entstehen korrigierte Werte für die Intensität eines Chips, wodurch Variationen von Chip-zu-Chip ausgeglichen werden.

Gleichung 35 Korrektur von Chip-zu-Chip-Variationen

$$\widetilde{N}_{korr}(M)_{korr} = \widetilde{N}(M)_{korr} \cdot \frac{const}{\widetilde{N}(ref)}$$

$\widetilde{N}_{korr}(M)_{korr}$ = Chip-zu-Chip korrigierte Intensität eines Chips berechnet aus Spot-zu-Spot korrigierten Werten

$\widetilde{N}(M)_{korr}$ = Median der korrigierten Intensitätswerte der Mess-Spots

$\widetilde{N}(ref)$ = Median der Intensitäten der Referenz-Spots

$const$ = Konstante [10]

Als Chipreplika wird eine Anzahl von Chips genannt, die unter gleichen Bedingungen mit gleicher Analytkonzentration prozessiert wurden. Für Chipreplika können dann die Mittelwerte $Ø\widetilde{N}(M)$ verschiedener Chips und deren Standardabweichungen σ berechnet werden, um den Variationskoeffizienten VarK zu bestimmen.

Gleichung 36 Variationskoeffizienten von Chipreplika

$$VarK = \frac{\sigma}{Ø\widetilde{N}(M)}$$

mit

$$Ø\widetilde{N}(M) = \frac{\sum_{j=1}^{m} \widetilde{N}(M)_j}{m}$$

und

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^{m} (\widetilde{N}(M)_j - Ø\widetilde{N}(M))^2}$$

VarK = Variationskoeffizient [%]

σ = Standardabweichung Chipreplika

$Ø\widetilde{N}(M)$ = Mittelwert von Chipreplika

$\widetilde{N}(M)$ = Intensität eines Chips

m = Anzahl der Chipreplika

Somit kann der VarK aus den Intensitäten von Chip-zu-Chip und Spot-zu-Spot korrigierten Werten $\widetilde{N}_{korr}(M)_{korr}$, aus Spot-zu-Spot korrigierten Werten $\widetilde{S}(M)_{korr}$ und den unveränderten Werten der Originale $\widetilde{N}(M)_{org}$ berechnet werden. Damit kann der Einfluss der verschiedenen Korrekturen mit dem Original verglichen werden.

17.3 Berechnung homogener Referenzierung

Wiederum ist die Berechnung der Werte so aufgebaut, dass zuerst Spot-zu-Spot Varianzen und anschließend Chip-zu-Chip Varianzen ausgeglichen werden. Da bei der homogenen Referenzierung die Spotting-Referenzantikörper mit den Spotting-Messantikörpern vorgemischt sind, wird der Median der Intensitäten der Referenzreaktion $\widetilde{N}(ref)$ aus der Messung nach der Inkubation der Probe im passenden Kanal für den Farbstoff erfasst mit:

Gleichung 37 Median der Intensitäten der Referenzreaktionen

$$\tilde{N}(ref) = \begin{cases} N(ref)_{\frac{n+1}{2}} & n \text{ ungerade} \\ \frac{1}{2}\left(N(ref)_{\frac{n}{2}} + N(ref)_{\frac{n}{2}+1} \right) & n \text{ gerade} \end{cases}$$

$\tilde{N}(ref)$ = Median der Intensitäten der Referenzreaktionen
$N(ref)$ = Intensität der Referenzreaktion
n = Anzahl der Referenz-Spots

Anschließend wird die Intensität nach der Inkubationsphase der Detektionsantikörper der Analyten aufgenommen und mit den Werten der Referenzreaktion korrigiert mit:

Gleichung 38 Korrigierter Intensitätswert der Nachweisreaktion eines Mess-Spots

$$N(M)_{korr} = N(M) \cdot \frac{\tilde{N}(ref)}{N(ref)}$$

$N(M)_{korr}$ = Korrigierte Intensität des Analyten
$\tilde{N}(ref)$ = Median der Intensitäten der Referenz
$N(ref)$ = Intensitäten der Referenz
$N(M)$ = Intensität des Analyten

Durch Multiplikation der Intensität der Nachweisreaktion $N(M)$ mit dem Quotienten des Medians der Intensitäten der Referenzreaktion $\tilde{N}(ref)$ mit den einzelnen Intensitäten der Referenz $N(ref)$ wird der korrigierte Intensitätswert der Nachweisreaktion $N(M)_{korr}$ ermittelt. An dieser Stelle folgt die weitere Berechnung der Werte der Chip-Intensitäten äquivalent zur Gleichung 35 bis Gleichung 36, beschrieben in der heterogenen Referenzierung.

17.4 Korrekturfaktor

Im späteren Verlauf der Arbeit wird ein Korrekturfaktor berechnet werden. Dies ist dann notwendig, wenn neue Lösungen von Detektionsantikörpern oder vor allem neue Proben innerhalb einer Messreihe angemischt werden.

Gleichung 39 Korrektur von Datensätzen

$$const_{neu} = const_{alt} \cdot \frac{\tilde{N}(ref)_{alt}}{\tilde{N}(ref)_{neu}} \cdot \frac{\tilde{N}(M)_{org,alt}}{\tilde{N}(M)_{org,neu}}$$

$const_{neu,alt}$ = Neue bzw. alte Korrekturkonstante
$\tilde{N}(ref)_{neu,alt}$ = Neue bzw. alte Intensität der Referenz
$\tilde{N}(M)_{org,neu,alt}$ = Neuer bzw. alter originaler Intensitätswert des Analyten

Die neue Konstante $const_{neu}$ wird somit durch Bildung des Verhältniswertes der vorherigen originalen Intensitätswerte $\tilde{N}(M)_{org,alt}$ und deren Referenz $\tilde{N}(ref)_{alt}$ mit den neu gewonnenen originalen Intensitätswerten der Messung mit neuen Proben und Sonden

$\widetilde{N}(M)_{org,neu}$ und $\widetilde{N}(ref)_{neu}$ verrechnet. $const_{neu}$ ist somit bis zur nächsten Änderung der Reagenzien gültig.

17.5 Zweikanalige homogene Referenzierung

Die Grundidee hinter einer zweikanaligen homogenen Referenzierung ist folgende: Unter Verwendung einer Anregungslichtquelle soll der Standard-Farbstoff des Immun-Tests und zusätzlich ein Referenzfarbstoff mit höherer emittierenden Wellenlänge angeregt werden. Durch Verwendung von zwei Interferenzfiltern im optischen Kanal des Wellenleiterfluorometers soll so der Standard-Farbstoff und Referenzfarbstoff spektral voneinander getrennt detektiert werden. Wenn die zwei optischen Kanäle zu 100 % getrennt werden könnten, könnten theoretisch die zwei Signale eines Spots zu jedem beliebigen Zeitpunkt erfasst werden und durch Quotientenbildung die Testmessung referenziert werden, um so Schwankungen in den Signalen auszugleichen. Bei der homogenen Referenzierung befindet sich ein unmarkierter Referenz-Antikörper innerhalb eines Mikrospots zusammen mit den Antikörpern für den eigentlichen Immun-Test, der gespottet wird. Dieser reagiert mit einem Antikörper, der mit dem Referenzfarbstoff markiert ist. Somit nimmt ein Mikrospot zwei Signale auf: Das der Referenz und das des Test-Signals. Die Reaktion, Durchführung und Berechnung der zweikanaligen homogenen Referenzierung ist in Kapitel 17.1 und 17.3 beschrieben. Da der Referenzfarbstoff durch eine Reaktion aufgebracht wird und die Reaktionspartner im Spottingprozess integriert sind, könnte auf diese Weise eine Großzahl der Fehler aus Tabelle 9 ausgeglichen werden. Da für zweikanalige homogene Referenzierung ein zweiter Farbstoff für die Referenz mit höherer Wellenlänge zum Einsatz kommen soll, wird in den folgenden Kapiteln zuerst ein passender Farbstoff ausgewählt. Anschließend wird dieser Farbstoff zusammen mit einem nicht-kompetitiven Test mit IL-6 getestet, um den Einfluss auf die Varianzen von Spot-zu-Spot und Chip-zu-Chip zu ermitteln.

17.5.1 Auswahl des Farbstoffs

Für die Auswahl des Referenzfarbstoffs sind drei Farbstoffe und der Standardfarbstoff untersucht worden, die im Folgenden aufgelistet werden. Die Farbstoffe werden im angegeben Filter ausgelesen, welcher sich in der Optik-Einheit des WLS befindet, siehe Kapitel 8.1 „Optik-Einheit“. Filter 667/30 ist durchlässig zwischen 652-682 nm, Filter 720/30 zwischen 705-735 nm und Filter 785LP ist ab 785 nm durchlässig.

- Farbstoff DY647 → Filter 667/30
  Dieser Farbstoff ist der Standard-Farbstoff für den Immun-Test des Analyten, Emissionsmaximum bei 668 nm.
- Farbstoff Alexa 700 → Filter 720/30
  Emissionsmaximum bei 719 nm.

- Farbstoff Alexa 750 → Filter 785LP
  Emissionsmaximum bei 780 nm.
- Farbstoff APC Dy7 → Filter 785LP
  Emissionsmaximum bei 778 nm. Hierbei handelt es sich um einen Tandemfarbstoff. Der Laser regt intern einen Farbstoff an, dieser emittiert Licht bei ca. 660 nm. Dieses Licht wird aber wiederum von einem Farbstoff absorbiert, der bei 778 nm abstrahlt. So kann ein sehr hoher Stokes-Shift erzeugt werden.

Die letzten drei aufgezählten Farbstoffe sind die potentiellen Kandidaten für den Farbstoff der Referenzreaktion. Die Farbstoffe werden vor der Untersuchung im WLS in einem Spektrometer auf das Emissionsspektrum untersucht, diese Angaben werden mit den Angaben der Hersteller verglichen.

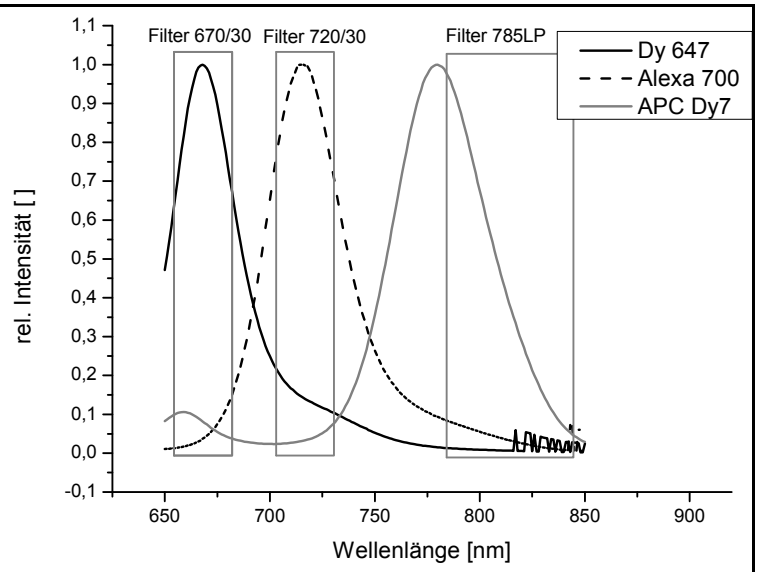


Abb. 50 Emissionsspektrum der Farbstoffe Dy647, Alexa 700 und APC Dy7

Emissionsspektrum der Farbstoffe Dy 647, Alexa 700 und APC Dy7 im Spektrometer Fluorolog bei 636 nm. Die Markierungen der Filter geben den durchlässigen Bereich an. Die Spektren stimmen mit den Angaben der Hersteller überein.

In Abb. 50 ist die Untersuchung der Emissionsspektren der Farbstoffe Dy 647, Alexa 700 und APC Dy 7 zu sehen. Die absoluten Intensitäten der Spektren sind in diesem Graphen normiert und nicht direkt vergleichbar. Die absoluten Intensitäten werden später im WLS untersucht. Die Emissionsmaxima stimmen durchweg mit den Herstellerangaben überein. Die Markierung der optischen Filter zeigt, dass die Filter für eine spätere Detektion im WLS gut gewählt sind. Jedoch sind hier bereits Signalüberlappungen erkennbar, die zu einem optischen Übersprechen in den Kanälen führen werden. Als Übersprechen wird der Übertrag eines Signals eines Farbstoffs in den zweiten Kanal benannt. Der APC Dy7 hat durch seine innere Umwandlung der Energie bei ca. 660 nm ein lokales Maximum, das im Bereich des Standard-Farbstoffs Licht emittiert, welches somit nicht spektral getrennt werden kann. Auch die Flanke des Emissionsspektrums des Alexa 700 tritt zu einem Anteil in den Bereich des Standard-Farbstoffs über. Noch stärker tritt die Flanke des Standard-Farbstoffs in den Kanal des Alexa 700 über, im Filter 785 LP ist dieser jedoch kaum zu sehen.

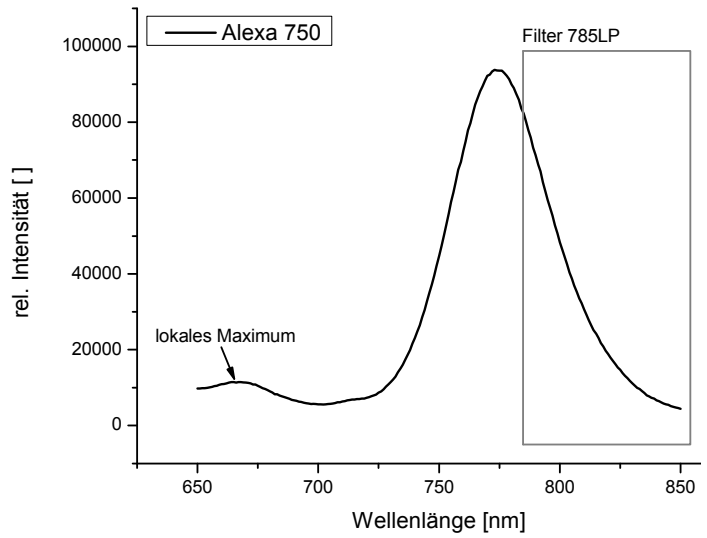


Abb. 51 Emissionsspektrum Alexa 750

Emissionsspektrum des Farbstoffs Alexa 750 im Spektrometer Fluorolog bei 636 nm. Die Markierungen des Filters geben den durchlässigen Bereich an. Ein lokales Maximum wurde detektiert, das nicht in den Herstellangaben vermerkt ist.

In Abb. 51 ist das Spektrum des Farbstoffs Alexa 750 gezeigt. Im Graphen ist ein lokales Maximum eingezeichnet, welches in den Angaben des Herstellers nicht zu finden war. Das Maximum befindet sich wiederum im Bereich des Standard-Farbstoffs und wird somit zu einem optischen Übersprechen führen.

Als nächstes werden die Farbstoffe für das optische Übersprechen zwischen den Kanälen im WLS ermittelt. Dies ist ausschlaggebend für den Nutzen einer zweikanaligen Detektion. Strahlt z. B. der Referenzfarbstoff zu stark in den Kanal des Standard-Farbstoffs über, wird dessen Signal verfälscht, dies ist nicht erwünscht.

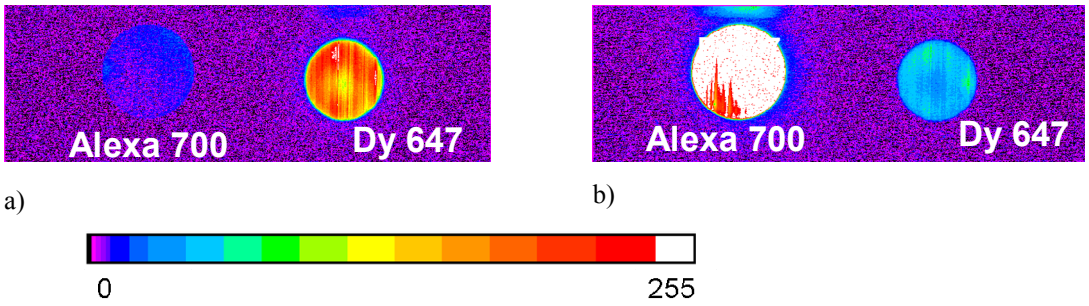


Abb. 52 Aufnahme der Fluoreszenz in den optischen Kanälen des WLS

Die Farbstoffe Alexa 700 und Dy 647 in a) Filter 670/30 und in b) 720/30 im WLS bei identischer Integrationszeit. Zu sehen ist ein schwaches Signal in Filter 670/30 und eine starkes Signal in 720/30 für Alexa 700. Für den Dy 647 ist der Effekt umgekehrt. Dieser Effekt stimmt mit den Emissionsspektren überein.

In Abb. 52 ist das Verhalten des Übersprechens am Beispiel der Farbstoffe Alexa 700 und Dy 647 gezeigt. Die Laserleistung und die Integrationszeit sind für Bild a) und b) identisch. Es ist deutlich zu sehen, dass der Farbstoff Alexa 700 im Filter 720/30 ein starkes und im Filter 670/30 ein schwächeres Signal aufweist, was mit den ermittelten Spektren übereinstimmt. Diese Art von Versuch wird für alle drei potentiellen Referenzfarbstoffe durchgeführt. Für die Ermittlung einer Kenngröße des optischen Übersprechens wird Folgendes definiert:

Gleichung 40 Definition optisches Übersprechen

$\ddot{U} = \frac{N(M)_x}{N(M)_y} \cdot 100\%$	Ü = Verhältnis des Übersprechens [%] $N(M)_x$ = Nutzsignal des Farbstoffs im zweiten Kanal $N(M)_y$ = Nutzsignal im zum Farbstoff passenden Kanal

Durch Bildung eines Quotienten vom Nutzsignal des Filters, welcher für den Farbstoff passend ist mit $N(M)_y$ zum zweiten Kanal des WLS mit $N(M)_x$, wird das Übersprechen berechnet. In Tabelle 10 ist dieses Verhältnis für alle Farbstoffe im Vergleich mit dem Standard-Filter ausgewertet:

Tabelle 10 Verhältnis des Übersprechens

Dy 647 $N(M)_y$=670/30	Alexa 700 $N(M)_y$=720/30	Alexa750 $N(M)_y$=785LP	APC Dy7 $N(M)_y$=785 LP
$N(M)_x$: Filter 720/30 Ü = 18 %	$N(M)_x$: Filter 667/30 Ü = 9 %	$N(M)_x$: Filter 667/30 Ü = 8 %	$N(M)_x$: Filter 667/30 Ü = 34 %
$N(M)_x$: Filter 785 LP Ü = 3 %			

Anhand des Farbstoffs Dy 647 ist deutlich zu sehen, dass dieser im Filter 720/30 um Faktor 18 % und im Filter 785 LP nur um Faktor 3 % überspricht, somit wird er im letzteren Filter 6 mal stärker unterdrückt. Der Farbstoff Alexa 700 hat ein Übersprechen von 9 % in den Standard-Filter. Überraschenderweise liegt der Alexa 750 mit 8 % Übersprechen kaum unter diesem Wert, obwohl das Spektrum dieses Farbstoffs ein viel höheres Verhältnis vermuten lässt. Auch der APC Dy7 bleibt mit einem Übersprechen von 34 % in den Standard-Filter weit hinter den Erwartungen der Emissionsspektren zurück. Grund für diese niedrigen Faktoren ist vermutlich eine spektrale Verschiebung bei der Oberflächenanbindung der Farbstoffe. Zusätzlich stören beim Alexa 700 und beim APC Dy7 die im Spektrometer ermittelten lokalen Maxima stark. Unter Berücksichtigung aller gewonnen Erkenntnisse wird der Farbstoff Alexa 700 als Referenz-Farbstoff für weitere Versuche ausgewählt. Der Farbstoff weist die höchsten Nutzsignale mit gleichzeitig akzeptablem Übersprechen auf.

17.5.2 Korrekturen mit zweikanaliger homogener Referenzierung

Tabelle 11 Zweikanalige Spot-zu-Spot Korrektur

VarK $N(M)_{org}$ [%]				Vark $N(M)_{korr}$ [%]		
R:AK				R:AK		
1:2	1:4	1:5		1:2	1:4	1:5
19	19	35		18	17	27
21	21	28		19	20	25
16	15	22		13	11	18
32	35	42		24	22	25
14	16	51		16	19	52
23	19	21		27	18	17
34	44	41		29	42	31
31	31	33		38	41	38
20	24	32		22	29	28
Mittelwert						
23	25	34		23	24	29

Nach der Auswahl des Farbstoffs Alexa 700 im vorangegangen Kapitel wird die zweikanalige homogene Referenzierung in Verbindung mit einem nicht-kompetitiven Test für PCT verbunden. Bei der Durchführung des Tests nach Kapitel 17.1 und der Berechnung nach Kapitel 17.3 konnte keine signifikante Verbesserung der Varianzen von Spot-zu-Spot festgehalten werden, siehe Tabelle 11. Keine der drei Mischungsverhältnisse mit 1:2, 1:4 und 1:5 der Spotting-Referenzantikörper R zu Spottingantikörper AK war hierbei erfolgreich. Die Mittelwerte der Korrektur bei 1:2 und 1:4 zeigen keine signifikante Verbesserung und liegen mit 23 % bzw. 25 % nach der Referenzierung bei fast identischen Werten. Beim Mischungsverhältnis 1:5 wird zwar der Mittelwert von 34 % auf 29 % reduziert, jedoch ist auch hier bei genauerer Betrachtung nicht die Referenzierung die Ursache. Deutlich wird dies bei der Betrachtung der Variation von Chip-zu-Chip. Hier konnten die Variationen bei n = 4 Replika im Mittel nur um Faktor 1,07 verbessert werden. Dies ist eine sehr kleine Verbesserung. Grund hierfür ist vor allem ein optischer Fehler bei dem Kanal für den Alexa 700 Farbstoff, der durch den Interferenzfilter und das Tandemobjektiv verursacht wird. Die Unschärfe und die Abbildungsfehler verfälschen die Intensitäten der Ausleuchtung so stark, dass diese nicht zur Korrektur verwendet werden können. Dies wird dadurch bestätigt, da der Farbstoff Alexa 700 im Filter 667/30 ausgelesen wird, also nur dessen Übersprechen analysiert wird. Hier kann zwar nur der kleine Anteil des Übersprechens detektiert werden, aber dafür ohne optische Abbildungsfehler. Hierbei werden die Variationen derselben Replika der n = 4 Chips im Mittel um Faktor 2,1 verbessert.

17.6 Einkanalige homogene Referenzierung

Die Grundidee hinter diesem Test ist die, dass der verwendete Farbstoff für den Detektions-Referenzantikörper derselbe ist, wie für den eigentlichen Immun-Test. So können keine optischen Phänomene die Signalaufnahme verfälschen, wie es bei der zweikanaligen homogenen Referenzierung der Fall ist. Da die Signalaufnahme der Referenz nach der Inkubation der Antigene stattfindet, kann diese Technik nur bei nicht-kompetitiven Tests angewandt werden, da hier die Aufnahme des Signals des eigentlichen Immun-

Tests nach einer zweiten Inkubationsphase aufgenommen wird. Für bindungsinhibitierende Tests wird das Signal des eigentlichen Immun-Tests in derselben Phase wie das Referenz-Signal aufgenommen; es kann somit weder zeitlich noch spektral voneinander getrennt werden und ist daher nicht zu verwenden. Der genaue Ablauf ist in Kapitel 17.1 „Reaktion und Signalaufnahme“ beschrieben. Die homogene Referenzierung wird wie in Kapitel 17.3 berechnet, die Reaktion ist in Kapitel 17.1 beschrieben. Als Grundlage für die Untersuchungen dient der nicht-kompetitive Test mit IL-6 und Dy 647 als Referenzfarbstoff.

17.6.1 Einkanalige homogene Spot-zu-Spot Korrektur

Tabelle 12 Einkanalige Spot-zu-Spot Korrektur

Chip Nr.	VarK $N(M)_{org}$ [%]	VarK $N(M)_{korr}$ [%]
1	15	6
2	18	7
3	20	6
4	9	18
5	18	19
6	16	10
7	18	21
8	9	19
9	12	25
10	12	18
11	21	15
12	11	14
13	14	8
14	24	7
15	15	7
16	9	10
17	18	7
18	14	4
19	48	56
20	14	32
21	16	5
	Mittelwert	
	17	15

In Tabelle 12 ist der Variationskoeffizient von Spot-zu-Spot von homogenen Spots im Verhältnis 1:20 im Original $N(M)_{org}$ und von Spot-zu-Spot korrigiert mit $N(M)_{korr}$ zu sehen. Die Schwankungen des Originals betragen im Mittel 17 % ± 8 % nach der Referenzierung 15 % ± 12 %. Somit verbessert die Referenzierung die Variation nicht signifikant. Die in „Rot“ markierten Felder zeigen die Chips mit fehlerhafter Korrektur an. In diesem Datensatz werden also nur ca. 47 % korrigiert. Ohne diese roten Felder würde die Varianz im Original 17 % ± 3 % und nach der Referenzierung 7 % ± 3 % betragen. Das zeigt, dass die homogene Referenzierung eine Kapazität zur Korrektur hat. Der Grund für die jedoch häufigen Fehlkorrekturen ist hauptsächlich bei der Funktionalität der Spots zu suchen. Die Reaktion der Referenz und die Reaktion des Analyten scheinen hier nicht gleichmäßig genug abzulaufen. Diese Vermutung wird im weiteren Verlauf der Arbeit noch genauer untersucht.

Zusammengefasst bietet die einkanalige homogene Spot-zu-Spot-Korrektur Potential zur Verbesserung von Fehlern. Beim Datensatz mit Verbesserung liegt der VarK durchschnittlich um Faktor 2,5 verbessert im Vergleich zum Original, jedoch ist die Erfolgsquote zur Verbesserung der Datensätze mit 48 % sehr niedrig.

17.6.2 Einkanalige homogene Chip-zu-Chip Korrektur

Tabelle 13 Chip-zu-Chip Korrektur

Verhältnis R:Ak	VarK $\tilde{N}(M)_{org}$ [%]	VarK $\tilde{N}_{korr}(M)_{korr}$ [%]
1:20	18	24
1:20	4	2
1:20	7	2
1:20	54	23
1:20	19	10
1:20	24	27
1:20	50	9
1:20	59	105
1:12	36	11
1:30	38	17
1:12	23	2
1:30	25	3
1:20	40	8
1:50	40	12
1:20	32	14
1:50	23	12
1:20	32	17
1:50	23	19
1:20	30	7
1:50	30	7
1:20	52	5
1:50	60	12
1:20	48	22
1:50	66	20
	Mittelwert	
	35	16

In Tabelle 13 sind Variationskoeffizienten von Replikatsmessungen zu sehen. Die Angabe „R:Ak“ gibt das Verhältnis der Menge Spotting-Referenzantikörper zu Spottingantikörper des Analyten an. Im Mittel wird der Datensatz von 35 % auf 16 % verbessert. Die Felder in „Rot“ markieren die Korrekturen bei denen der VarK verschlechtert wird. Ohne die Ausreißer würde die Abweichung von 34 % ± 16 % auf 11 ± 6 % verbessert werden. Auffällig ist hier, dass die Erfolgsquote einer positiven Korrektur bei ca. 87 % der Datenmenge liegt, also weit höher als in Tabelle 12 der Spot-zu-Spot-Korrektur mit nur 47 %. Ein Zusammenhang zwischen der Spot-zu-Spot-Korrektur und der Chip-zu-Chip-Korrektur konnte nicht hergestellt werden. Im Gesamten bringt die homogene Referenzierung mit einem mittleren Faktor von 2,1 eine hohe Verbesserung des Datensatzes mit sich. In „Gelb“ sind Werte unterhalb von 15 % markiert. Diese Replika würden die Richtlinie der FDA erfüllen, wenn von einer Steigung von „1“ bei der Standardkurve ausgegangen wird. Durch die Referenzierung wird die Menge an Replika unterhalb dem Grenzwert von 15 % vom Original mit 8 % auf 58 % verbessert. Zusammengefasst bewirkt die einkanalige homogene Referenzierung eine signifikante Verbesserung der Variationskoeffizienten von Chip-zu-Chip-Replika.

17.6.3 Standardkurven mit einkanaliger homogener Referenzierung

Die Kapazität zur Referenzierung der einkanaligen homogenen Spots bei der Korrektur von Varianzen von Chip-zu-Chip wurde im vorangegangen Kapitel gezeigt. Aus diesem

Grund soll an dieser Stelle die Tauglichkeit für dynamische Messungen mit variierender Analytkonzentration anhand von Standardkurven ermittelt werden. Die Durchführung solcher Standardtests ist in Kapitel 3.4 „Analyse von Biochipsignalen“ beschrieben. Der Fokus soll hierbei auf die Charakteristika Detektionslimit (LOD), Quantifizierungslimit (LLOQ), Unrichtigkeit und Unpräzision gelegt werden. Diese Kenndaten werden mit Mess-Spots ohne Referenzantikörper auf Basis eines nicht-kompetitiven Tests für IL-6 verglichen.

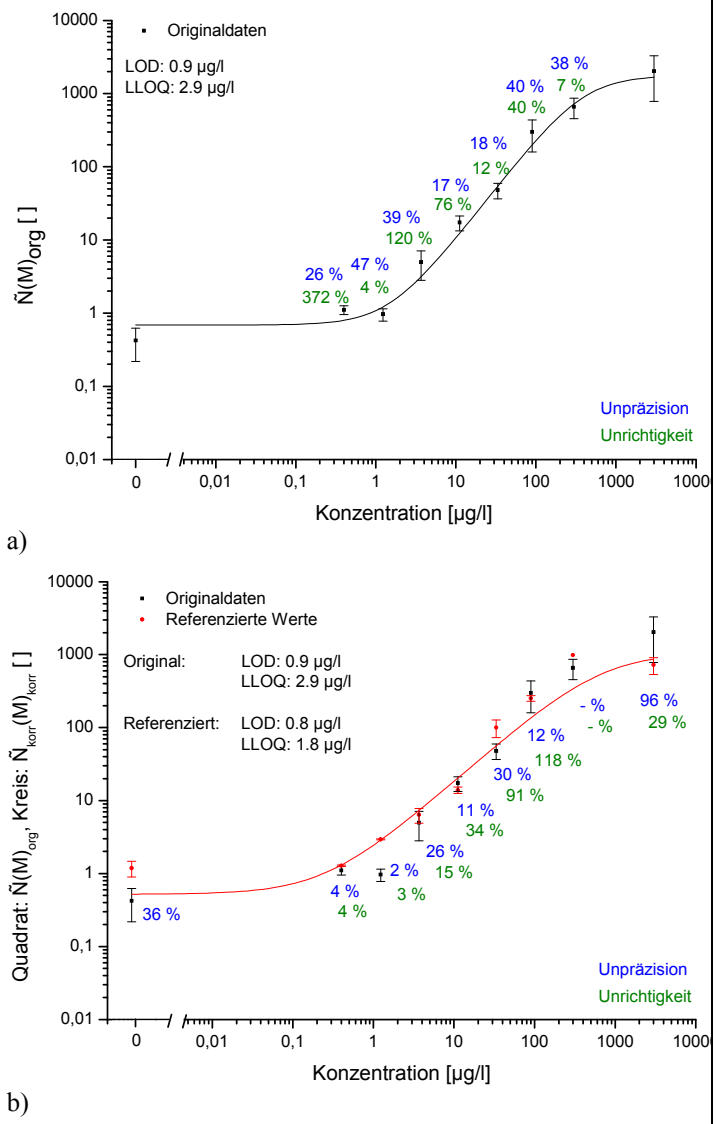


Abb. 53 Homogene Referenzreaktion mit IL-6 in Puffer

a) Mess-Spots: Immobilisierter Nachweisantikörper 0,2 mg/ml, markierter Detektionsantikörper für IL-6 1,11 µg/ml

b) Referenz-Spots: Immobilisierter Referenzantikörper 5 mg/l, immobilisierter Nachweisantikörper 100 mg/l, markierter Referenzantikörper 0,01 mg/l, Detektionsantikörper für IL-6 1,11 mg/l.

In Abb. 53 ist eine Messreihe mit den Konzentrationen für IL-6 mit 0,4 - 1,2 - 3,7 - 11 - 33 - 90 - 300 - 3000 µg/l und einer Nullprobe in Puffer gezeigt. Die Originalwerte in a) beziehen sich auf reine Mess-Spots, also ohne integrierte Referenzantikörper, während die referenzierten Werte in b) den homogenen Spots entsprechen.

Dabei ist zu sehen, dass die grundsätzliche Funktion der homogenen Spots gegeben ist. Die Konzentrationsabhängigkeit zum Analyten ist vorhanden. Die LOD von Original und Referenz sind nahezu identisch mit 0,8 bzw. 0,9 µg/l. Im Mittel liegt die Unpräzision der Originalwerte zwischen 0,4 - 30 µg/l bei 31 %, wobei hiervon nur drei Replikate unterhalb von 15 % liegen. Die referenzierten Werte weisen hier ein Mittel von 14 % auf, eine deutliche Verbesserung um einen Faktor von ca. 2,2. Auch die Unrichtigkeit wird im Mittel von 104 % auf 44 % durch die Referenzierung verbessert,

was generell darauf hinweist, dass der Datensatz referenziert konsistenter wird. Wiederum eine sehr überzeugende Leistung. Beim Replikat bei 300 µg/l ist jedoch auch eine fehlerhafte Referenzierung zu sehen, wodurch der Datensatz sehr stark verschlechtert wird. Die Ursachen dieses Fehlers sollen im späteren Verlauf der Arbeit geklärt werden. Des Weiteren ist eine stark erhöhte Nullprobe bei der heterogenen Standardkurve zu sehen. Die Ursache hierfür ist das entstandene Signal durch den Referenz-Detektionsantikörper. Hierdurch wird in der Praxis der LOD noch oben gezogen und somit auch der dynamische Bereich verringert. Die Steigung der Standardkurve der referenzierten Daten ist im Vergleich zu den Originaldaten zusätzlich vermindert. Dies wird vermutlich durch eine Hemmung der Reaktion der IL-6 Antigene durch die Anwesenheit der Referenz-Antikörper verursacht. Letztere zwei Punkte reduzieren somit den dynamischen Messbereich der homogenen Spots.

Zusammengefasst kann die homogene Referenzierung dazu beitragen, die Ungenauigkeit und Unpräzision von Messungen stark zu reduzieren. Einbußen in der Sensitivität und im dynamischen Messbereich sind jedoch zu erwarten. Für IL-6 als klinischen Parameter ist diese Limitierung nicht zu tragen, da der Parameter in sehr geringen Konzentrationen im Blut vorliegt. Jedoch besteht durchaus Kapazität für die Messung von Parametern, die in höheren Konzentrationen vorliegen, wie z. B. das CRP.

17.7 Heterogene Referenzierung

Die Grundidee hinter dieser Referenzmethode ist, dass die Referenz-Spots benachbart zu den Mess-Spots angeordnet sind. Also ist, im Gegensatz zur homogenen Referenzierung, das Referenz-Signal und das Test-Signal örtlich voneinander getrennt. Deshalb kann der Referenz-Detektionsantikörper denselben Farbstoff aufweisen, wie der des eigentlichen Immun-Tests.

In den folgenden Kapiteln soll der Einfluss der heterogenen Referenzierung charakterisiert werden. Hierbei wird, wie zuvor für die homogene Referenzierung, der Einfluss auf Variationen von Spot-zu-Spot und Chip-zu-Chip untersucht. Anschließend wird die Methode bei der Generierung von Standardkurven mit klinischen Tests in Puffer und humanem Plasma als Matrix angewandt.

17.7.1 Heterogene Spot-zu-Spot Korrektur

Nach der Berechnung der Spot-zu-Spot-Korrektur nach Kapitel 17.2 werden mehrere Chipreplika für IL-6 untersucht. Die berechneten Variationskoeffizienten VarK der Originalwerte und der referenzierten Werte der Varianzen von Spots sind in Tabelle 14 ersichtlich, als Grundlage dienen 22 Spots pro Chip.

Tabelle 14 Spot-zu-Spot Korrektur

Chip Nr.	VarK $N(M)_{org}$ [%]	VarK $N(M)_{korr}$ [%]		Chip Nr.	VarK $N(M)_{org}$ [%]	VarK $N(M)_{korr}$ [%]
1	9	10		15	34	27
2	16	11		16	11	14
3	16	15		17	21	14
4	11	36		18	21	18
5	16	16		19	11	8
6	11	11		20	25	9
7	11	10		21	16	8
8	11	11		22	8	7
9	18	11		23	17	8
10	16	15		24	14	10
11	17	12		25	13	12
12	17	9		26	17	8
13	15	7		27	16	12
14	9	8				
	Mittelwert					
	VarK Original $N(M)_{org}$ [%]			VarK Referenz $N(M)_{korr}$ [%]		
	15			12		

Die Schwankungen des Originals betragen im Mittel 15 % ± 5 % nach der Referenzierung 12 % ± 6 %. Im gezeigten Datensatz wird zu 88 % eine Verbesserung der Spot-zu-Spot-Varianzen erreicht, signifikant fehlerhafte Referenzierungen sind in „Rot“ markiert. Somit greift die heterogene Referenzierung zum Ausgleich für Varianzen von Spot-zu-Spot gut, wobei schon die mittlere Spot-zu-Spot-Varianz der Originale von 15 % akzeptabel ist. Der hauptsächliche Grund der Verbesserung von Spot-zu-Spot Abweichungen ist der Ausgleich von Inhomogenitäten der Ausleuchtung und der Dämpfung. Die Varianzen nach der Referenzierung sind für ein Protein-Mikroarray überzeugend und für die exakte Aufnahme der Spot-Intensitäten ausreichend.

Am Datensatz ist zu sehen, dass die Verbesserung von Variationen von Spot-zu-Spot nicht gleichmäßig stattfindet. Das ist dadurch zu erklären, dass der Referenz-Spot zwar benachbart ist, aber er könnte potentiell einen anderen Spottingfehler beinhalten, wie der zugehörige Mess-Spot. Zusammengefasst erbringt die heterogene Referenzierung eine Verbesserung der Spot-zu-Spot-Varianzen von 20 %.

17.7.2 Heterogene Chip-zu-Chip Korrektur

Nach der Berechnung der Chip-zu-Chip Korrektur nach Kapitel 17.2 werden mehrere Chipreplika für PCT, IL-6 und NPT mit mindestens drei Replika prozessiert. In der folgenden Tabelle 15 sind also pro Zeile mindestens drei Chips für die Bestimmung des Variationskoeffizienten der Chips prozessiert.

Tabelle 15 Chip-zu-Chip Korrektur

VarK $\tilde{N}(M)_{org}$ [%]	VarK $\tilde{N}_{korr}(M)_{korr}$ [%]	Substanz
67	16	
13	3	
40	25	
23	16	
6	25	
16	5	
23	15	
17	19	PCT
27	8	
40	12	
26	23	
24	4	
36	14	
15	15	
60	9	
58	17	
40	8	
14	16	
19	2	
43	9	
23	19	
24	10	
47	7	
31	5	
61	40	IL-6
Mittelwert		
32	14	

VarK $\tilde{N}(M)_{org}$ [%]	VarK $\tilde{N}_{korr}(M)_{korr}$ [%]	Substanz
32	26	
14	9	
6	3	
41	12	
44	12	
13	13	
1	8	
48	7	
45	12	
43	43	
13	13	
31	5	
17	11	
17	29	
36	13	Neopterin
Mittelwert		
27	14	

Die Konzentration der Analyten für die Replika liegt im dynamischen Bereich der Standardkurven. Die Gegenüberstellung der Variationskoeffizienten VarK der Originalwerte und der Referenzwerte zeigt folgende Aufschlüsse: Die Chip-zu-Chip-Variation wird vom Original für nicht-kompetitive Tests für IL-6 und PCT von 32 % ± 17 % auf 14 % ± 8% verbessert. Die Referenzierung erbringt somit eine Verbesserung der mittleren Variation von 2,2. Für bindungsinhibitierende Tests mit NPT wird ein Verbesserung

von 27 % ± 16 % auf 14 % ± 10 % erreichet, was einem mittleren Faktor der Verbesserung von 1,9 entspricht. Hierbei muss erwähnt werden, dass bei Originaldaten mit sehr hoher Präzision auch eine leichte Verschlechterung durch Referenzierung eintreten kann, diese Felder sind in rot markiert. Diese ist jedoch meistens so minimal, dass sie vernachlässigt werden kann. Nur in seltenen Fällen tritt eine starke Erhöhung des Variationskoeffizienten auf, so in der fünften Reihe der PCT Messungen, bei der der Variationskoeffizient von 6 % auf 25 % zunimmt. Hervorgehoben sind in „Gelb“ Variationskoeffizienten unterhalb von 15 %. Diese Replika erfüllen die Richtlinie der FDA, wenn von einer Steigung von „1“ bei der Standardkurve ausgegangen wird. Vor der Referenzierung liegen nur drei Replika innerhalb der Grenze, somit nur 12 % der Anzahl der Messungen. Nach der Referenzierung sind es 64 % der Menge bei nicht-kompetitiven Tests und für die bindungsinhibitierenden Tests wird die Menge von 33 % auf 80 % erhöht. Somit besteht die Möglichkeit der Einhaltung der FDA-Richtlinien bezüglich der Unpräzision durch Verwendung der Referenzreaktion.

Die Verbindung der Chip-zu-Chip-Korrektur mit der Korrektur von Spot-zu-Spot im vorangegangenen Kapitel zeigte bei 78 % des Datensatzes zusätzlich eine mittlere Verbesserung von 2,5 % der Chip-zu-Chip-Variation. D. h. die Spot-zu-Spot-Korrektur trägt zu einem kleinen Anteil zu einer höheren Präzision der Chipmittelwerte bei. Insgesamt erbringt jedoch die Chip-zu-Chip-Korrektur den höchsten Grad an Verbesserung. Anhand der Erfahrung durch mehrere dieser Messreihen konnte deutlich ausgemacht werden, dass der Haupteinfluss für die gezeigte Qualität des Datensatzes am Spotting festzumachen ist.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass durch die heterogene Referenzierung eine signifikante Verbesserung der Variationskoeffizienten von Chipreplika hervorgerufen wird; bezogen auf Tabelle 15 greift die Methode bei 88 % des Datensatzes. Herausstechend ist, dass die Methode für bindungsinhibitierende und nicht-kompetitive Tests gleichermaßen greift, sie ist somit in vollem Umfang für Immun-Tests zur Diagnose von Sepsis einsetzbar.

17.7.3 Standardkurven in Puffer mit heterogener Referenzierung

In den bisherigen Kapiteln der heterogenen Referenzierung wurde die Verbesserung der Daten anhand der Spot-zu-Spot- und Chip-zu-Chip-Variation beschrieben. In diesem Kapitel soll der Einfluss auf Standardkurven gezeigt werden. Ziel hierbei ist die Ermittlung der Kapazität der heterogenen Referenzierung auf Standardkurven, dies betrifft vor allem die in Kapitel 3.4 „Analyse von Biochipsignalen“ beschriebenen Charakteristika: Detektionslimit (LOD), Quantifizierungslimit (LLOQ), Ungenauigkeit, Unrichtigkeit und dynamischer Bereich. Durch die Methoden und Berechnungen der heterogenen Referenzreaktion aus Kapitel 17.2 für einen nicht-kompetitiven Test mit IL-6 und einen bindungsinhibitierenden Test für NPT werden die Standardkurven hinsichtlich dieser

Charakteristika untersucht. Zuerst sollen hierbei die Einflüsse der Referenzreaktion mit Standardkurven im Puffer ermittelt werden.

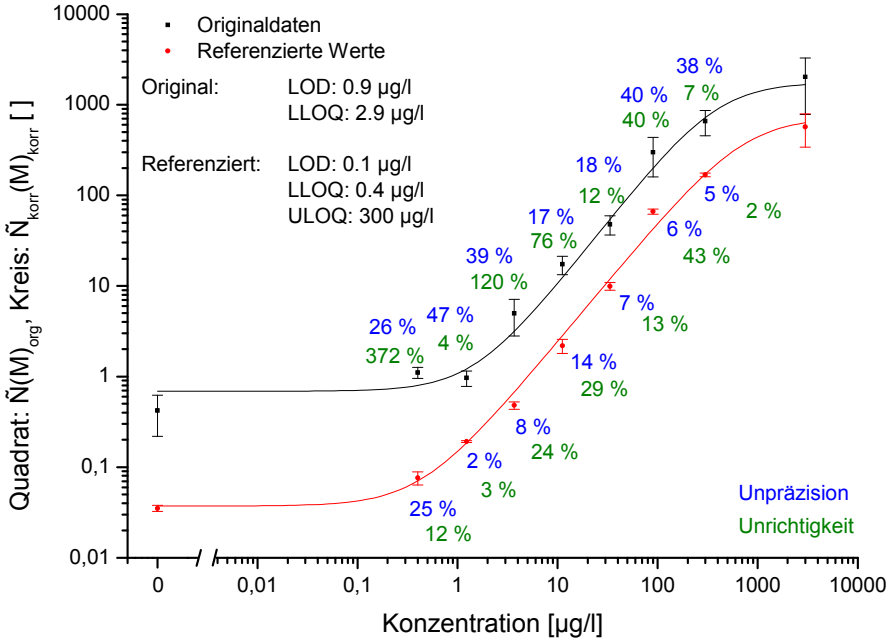


Abb. 54 Heterogene Referenzreaktion mit IL-6 in Puffer

Verwendete Reagenzien: Spotting-Referenzantikörper 85 mg/l, Spottingantikörper 300 mg/l für IL-6, Detektions-Referenzantikörper 0,01 mg/l, Detektionsantikörper für IL-6 2 mg/l.

Die in Abb. 54 erzeugte Standardkurve zeigt eine Messreihe mit 0,4 - 1,23 - 3,68 - 11,14 - 33,33 - 90 - 300 und 3000 µg/l IL-6 Antigen. Auf Grund der Prozessierung der Chips wurde eine Korrektur bei 11 µg/l nach Kapitel 17.4 „Korrekturfaktor“ vollzogen, hierauf wird im Verlauf der Arbeit noch eingegangen. Innerhalb des dynamischen Messbereichs der Standardkurve der referenzierten Werte in Abb. 54 liegen zwischen dem LLOQ von 0,53 µg/l und dem ULOQ von 300 µg/l sechs quantifizierbare Konzentrationen. Diese Replika liegen für die Unpräzision unterhalb der 15 % Grenze und sind somit valide. Verglichen zu den Originaldaten ist dies eine deutliche Verbesserung. Im Mittel wird die Unpräzision um Faktor 3,8 verbessert, hierbei wird durchgängig jedes Replikat verbessert. Auch die Unrichtigkeit wird im Schnitt deutlich um Faktor 2,3 durch die Referenzierung verbessert, drei dieser Replika erfüllen auch für die Unrichtigkeit den Grenzwert. Zusätzlich ist der LOD der referenzierten Daten 9-mal niedriger. Wie bereits erwähnt musste diese Standardkurve korrigiert werden, weshalb der gezeigte Kurvenverlauf kritisch hinterfragt wird. Im Laufe der darauf folgenden Versuche hat sich herausgestellt, dass die Korrektur nur auf Grund der Probenvorbereitung vollzogen werden musste. Die Konzentrationsserie der Proben und Detektionsantikörper müssen an einem Tag auf einmal angemischt werden, um zu einem konsistenten Signalverlauf zu führen. Werden Proben aus einer Stammlösung an einem Folgetag identisch vorbereitet, können hier starke Varianzen im Signal entstehen. Dieses Signal erfährt einen überproportional hohen Zuwachs und fügt sich somit nicht mehr konsistent in die Reihe

der bereits gewonnen Signale ein. Dieser Fehler ist, wie erwähnt, auch in den Standardkurven aus Kapitel 15.2 „Standardkurven in humanem Plasma„ enthalten. Alle in dieser Arbeit folgenden Standardkurven mussten aus diesem Grund nicht mehr kalibriert werden.

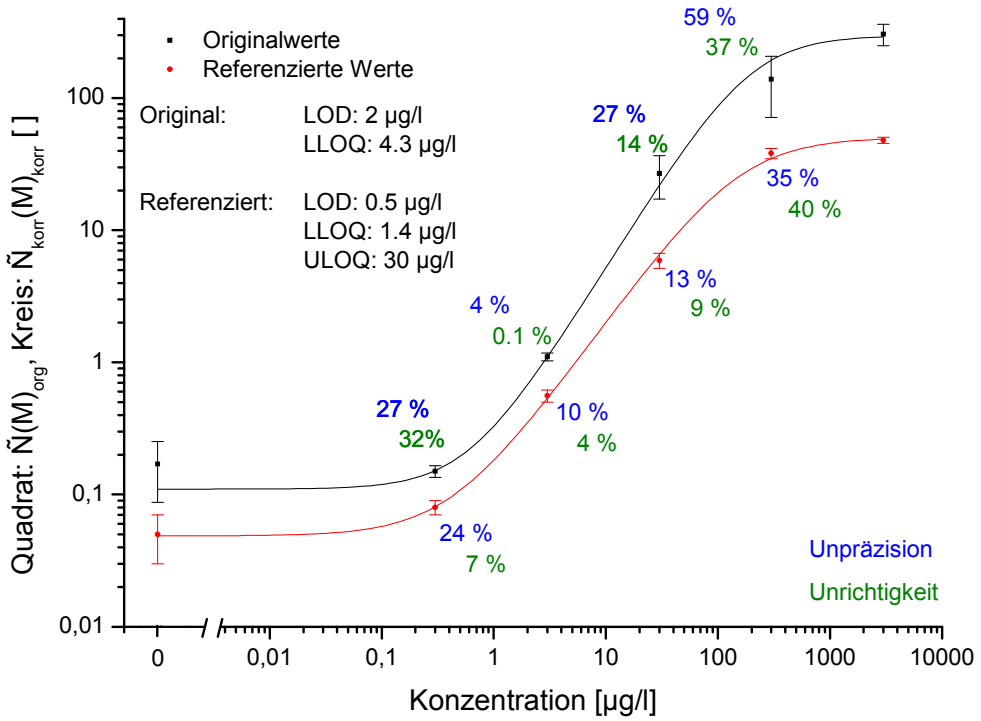


Abb. 55 Heterogene Referenzreaktion mit IL-6 in Puffer

Verwendete Reagenzien: Spotting-Referenzantikörper 85 mg/l, Spottingantikörper 300 mg/l für IL-6, Detektions-Referenzantikörper 0,01 mg/l, Detektionsantikörper für IL-6 2 mg/l.

Die in Abb. 55 erzeugte Standardkurve zeigt eine Messreihe mit den Antigenkonzentrationen für IL-6 mit 0 - 0,3 - 3 - 30 - 300 - 3000 µg/l und je drei Replika in Puffer. Nach dem ermittelten LLOQ mit 1,4 µg/l und dem ULOQ bei 30 µg/l liegen die Konzentrationen bei 3 µg/l und 30 µg/l im quantifizierbaren Messbereich. Für 3 µg/l liegt die Unpräzision bei 10 % und die Unrichtigkeit bei 4 %, für 30 µg/l 13 % bzw. 9 %. Die Originaldaten lagen bei 4 % und 0,1 % und 27 % und 14 %. Somit konnte durch die Referenzierung erreicht werden, dass man im quantifizierbaren Messbereich die Grenzwerte für eine positive Validierung erhält. Zusätzlich erbringt die Referenzierung eine Verbesserung des LOD um ca. Faktor 4. Für den dynamischen Messbereich liegen die obere und untere Sättigung der zwei Standardkurven in vergleichbaren Regionen, mit ca. 2 Dekaden. Durch die Verbesserung des LLOQ für Referenzwerte ist der dynamische Bereich somit auch leicht verbessert.

Die Versuche aus Abb. 54 und Abb. 55 sind unter identischen Prozessbedingungen entstanden. Die LOQ der Kurven liegen in vergleichbaren Konzentrationsbereichen, z. B. weißt der LLOQ der Kurven einen Unterschied von Faktor 3,5 auf, der ULOQ der Kur-

ven liegt um einen Faktor 5 auseinander. Somit zeigt Abb. 54 einen dynamischen Messbereich von ca. 3,3 Dekaden und Abb. 55 nur einen von ca. 2,7 Dekaden. Diese Diskrepanz wird zum einen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Variationen in der Chipherstellung verursacht, zum anderen durch die beschriebene fehlerhafte Probenvorbereitung von Abb. 54. Als Gemeinsamkeit zeigen die beiden Standardkurven jedoch die Reproduzierbarkeit der Funktionalität der heterogenen Referenzierung auf.

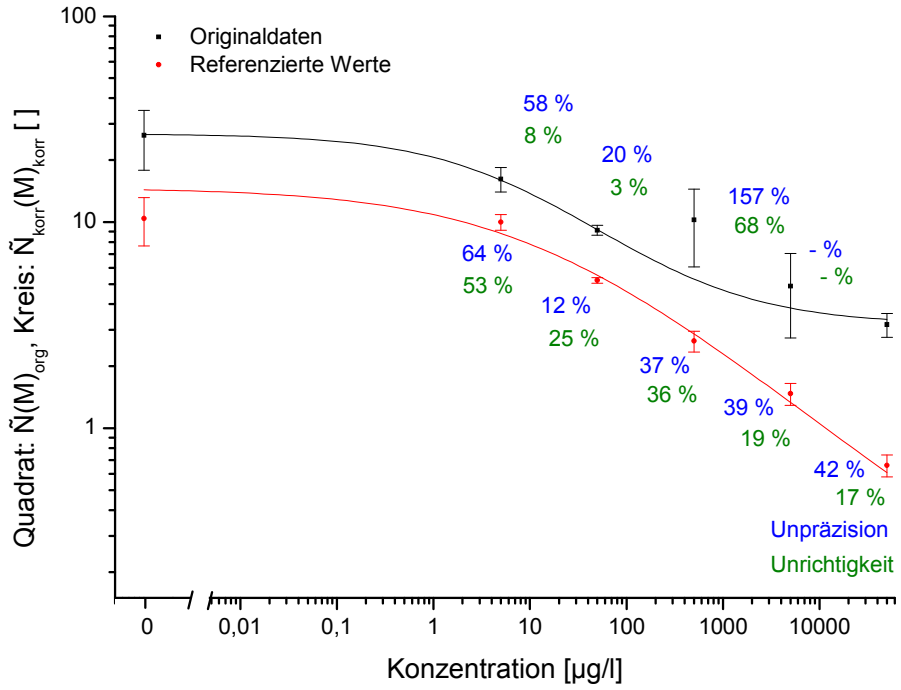


Abb. 56 Heterogene Referenzreaktion mit Neopterin in Puffer

Verwendete Reagenzien: Spotting-Referenzantikörper 85 mg/l, Spottingantikörper 250 mg/l für NPT, Detektions-Referenzantikörper 0,01 mg/l, Detektionsantikörper für NPT 0,1 mg/l.

In Abb. 56 ist ein Bindungsinhibitions-Test mit NPT zu sehen. Hierbei werden die Antigenkonzentrationen 0 - 5 -50 - 500 - 5000 - 50 000 µg/l in Puffer zugegeben. Es ist hervorzuheben, dass für diese Art Test nur die heterogene Referenzierung verwendet werden kann, da die Signale direkt nach der Inkubation der Antigene entstehen. Dabei ist deutlich zu sehen, dass Unpräzision und Ungenauigkeit erheblich durch die Referenzierung verbessert werden. Zudem ist der Kurvenlauf der Originaldaten stark verfälscht und inkonsistent. Die heterogene Referenzierung verhilft zu einem konsistenten Signalverlauf mit akzeptabler Unrichtigkeit. Da die Steigung der Standardkurve von Neopterin gering ist, ist die Unpräzision höher als der eigentliche Variationskoeffizient der einzelnen Replika. Somit liegt der Mittelwert der Variationskoeffizienten ohne Referenzierung bei 27 % und referenziert bei 12 %. Eine sehr deutliche Verbesserung. Durch die Referenzierung wird der dynamische Messbereich stark erhöht. Die Replika liegen zwar über der Grenze von 15 %, dennoch ist zu sehen, dass der lineare Messbereich der Referenzwerte mit ca. 5 Dekaden weit über dem der Originaldaten mit ca. 3 Dekaden liegt.

Angaben für LOD und LLOQ können für diese Kurve allerdings nicht berechnet werden, da die Grenzwerte überschritten sind. Anhand anderer Messreihen mit NPT wurde ermittelt, dass der Signalverlauf noch z. T. sehr inkonsistent abläuft. Der Test scheint von der biochemischen Seite her noch nicht vollständig optimiert zu sein. Für bessere Resultate sollten vor allem die Intensität und die Steigung der Messwerte erhöht werden.

Die Standardkurven für NPT aus Abb. 56 und für IL-6 aus Abb. 55 sind parallel als dualer Test entstanden. Somit ist auch gezeigt, dass die heterogene Referenzierung mit zwei Parametern gleichzeitig funktioniert. In allen Standardkurven trägt die heterogene Referenzierung stark zur Verbesserung der Präzision und Genauigkeit bei.

17.7.4 Standardkurven in Plasma mit heterogener Referenzierung

Im vorangegangen Kapitel ist die Funktionalität der heterogenen Referenzierung in Puffer gezeigt worden. In diesem Kapitel soll diese Funktion in humanem Plasma als Matrix der Antigene untersucht werden. Wiederum werden die Charakteristika LOD, LLOQ, Unrichtigkeit und Unpräzision durch Standardkurven bestimmt, die im Kapitel 3.4 „Analyse von Biochipsignalen“ beschriebenen sind. Wie bereits erwähnt, geben Standardkurven in Plasma eine optimale Grundlage für die Charakterisierung des WLS, da hier die Bedingungen der Realität sehr nahe kommen. Die Konzentrationswerte der Analyten der Plasmaprobe wurden wie zuvor durch klinisch etablierte Systeme als Normwerte sichergestellt, somit sind diese Konzentrationen im Vergleich zu den zugegeben Analyten vernachlässigbar, da sie unterhalb des Detektionslimits des WLS liegen.

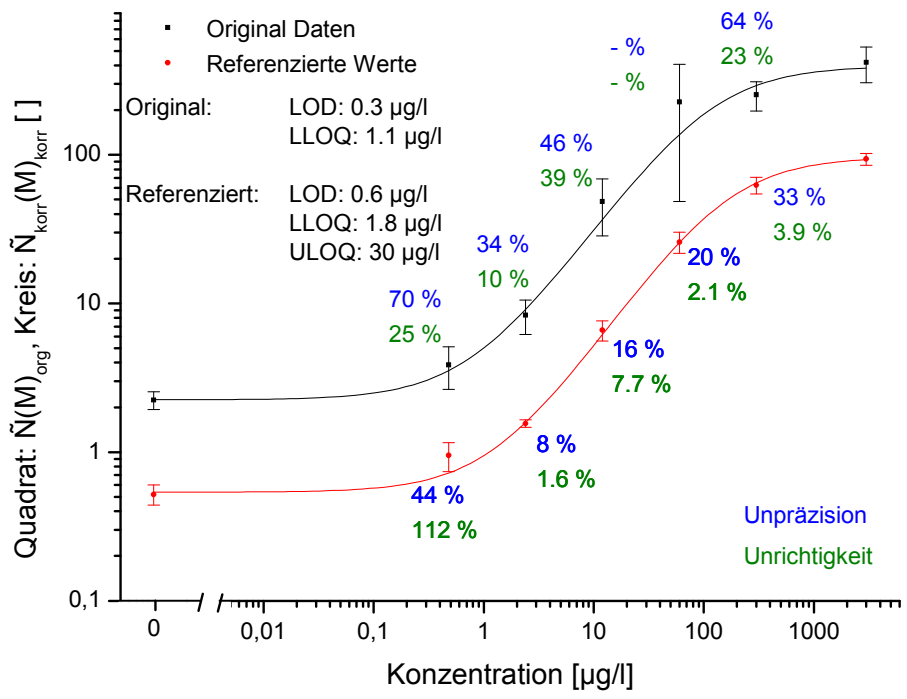


Abb. 57 Heterogene Referenzreaktion mit IL-6 in Plasma

Verwendete Reagenzien: Spotting-Referenzantikörper 85 mg/l, Spottingantikörper 300 mg/l für IL-6, Detektions-Referenzantikörper 0,01 mg/l, Detektionsantikörper für IL-6 2 mg/l.

In Abb. 57 ist die heterogene Referenzierung mit IL-6 mit den Antigenkonzentrationen 0 - 0,48 - 2,4 - 12 - 60 - 300 - 3000 µg/l in humanem Plasma zu sehen. Dieser Versuch zeigt die Kapazität der Methode unter realistischen Bedingungen. Wiederum konnte die Unpräzision deutlich verbessert werden und auch die Unrichtigkeit ist überzeugend und im gesamten Test unterhalb von 15 %. Ein LOD von 0,55 µg/l ist vergleichbar zu den Messergebnissen in Puffer mit 0,5 µg/l, 0,1 µg/l und 0,7 µg/l. Somit kann gesagt werden, dass die heterogene Referenzierung auch unter realistischen Bedingungen greift, Kreuzreaktionen oder Quereinflüsse sind nicht beobachtet worden. Die Originaldaten weisen zwar einen geringen LOD mit 0,3 µg/l auf, jedoch ist dies vermutlich die Ursache eines ungenauen Fits. Der Datensatz weist ohne Referenzierung sehr hohe Unrichtigkeiten und Unpräzisionen auf, wodurch die Fitfunktion kritisch hinterfragt werden muss. Im Gegensatz hierzu ist der referenzierte Datensatz sehr konsistent, im quantifizierbaren Messbereich liegt die Unpräzision < 20 %. Für eine positive Validierung müsste hier jedoch der Grenzwert auf 20 % erhöht werden. So ergibt sich ein ULOQ der Referenzdaten bei 30 µg/l. Der dynamische Messbereich liegt bei ca. 2 Dekaden und wird durch die Referenzierung nicht beeinträchtig.

Anhand der Erfahrung durch mehrere dieser Messreihen konnte ermittelt werden, dass der Haupteinfluss für die erzielte Qualität, im Speziellen für die Unpräzision der Messreihen, am Spotting festzumachen ist. Durch geeignete Optimierung des Spottings können die Kurven noch weiter verbessert werden, um für alle Replika die Richtlinie in Bezug auf Unpräzision und Unrichtigkeit zu erfüllen. Der Einfluss von mehreren Ana-

lyten oder Matrix-Effekten beeinflusst die heterogene Referenzierung nicht. Somit kann die Reaktion als Referenz unter realen Bedingungen verwendet werden, um die Qualität der Messergebnisse zu verbessern. Generell muss noch der dynamische Messbereich um ca. Faktor 10 verbessert werden, um den Bereich von 0,04-1,5 µg/l voll abzudecken.

In Abb. 58 ist eine identisch prozessierte Standardkurve zu Abb. 57 zu sehen. Ein niedriger LOD von 0,1 µg/l wird erreicht und die Replika liegen mit < 23 % für Unpräzision und Unrichtigkeit akkurat. Die Verbesserung zu den Originaldaten ist offensichtlich. Im Schnitt liegen Unpräzision mit Faktor 3,6 und Unrichtigkeit mit Faktor 2,3 der referenzierten Werte unterhalb der Werte der Originaldaten.

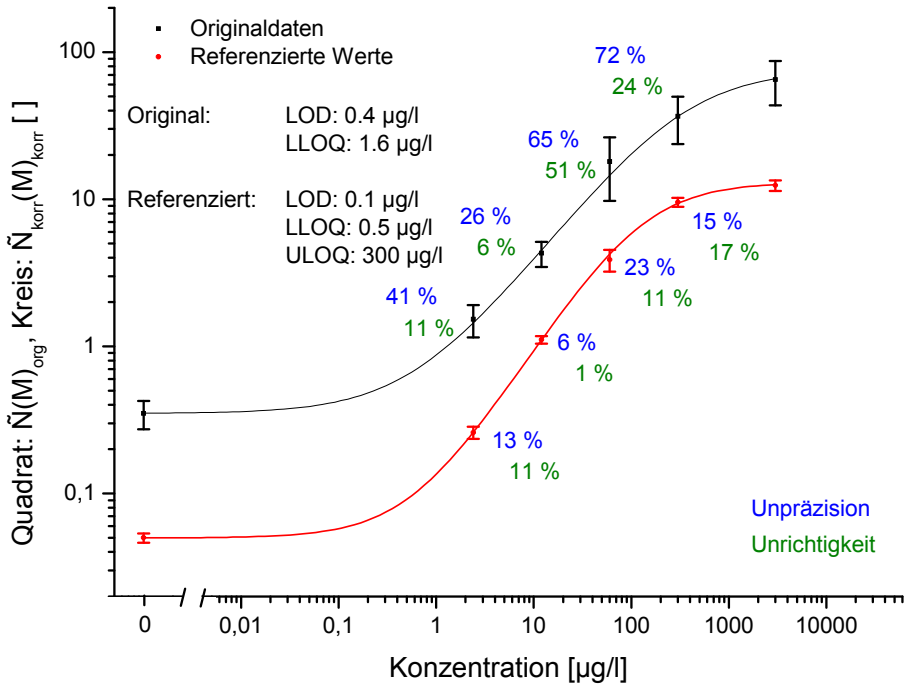


Abb. 58 Standardkurve mit IL-6 in Plasma

Verwendete Reagenzien: Spotting-Referenzantikörper 85 mg/l, Spottingantikörper 300 mg/l für IL-6, Detektions-Referenzantikörper 0,01 mg/l, Detektionsantikörper für IL-6 2 mg/l.

Die Standardkurve in Abb. 58 erfüllt die klinischen Anforderungen bezüglich Unpräzision und Unrichtigkeit nicht komplett. Grund ist das Replika bei 60µg/l. Die Replika bei 2,4 µg/l und 12 µg/l Konzentration liegen unter 15 %. Somit können die Messdaten mit Kennwerten < 25 % dennoch als sehr akkurat angesehen werden.

Der Vergleich der Standardkurven aus Abb. 57 und Abb. 58 zeigt einen unterschiedlichen Verlauf der absoluten gemessenen Intensitäten auf. Die absoluten Intensität für $\tilde{N}_{korr}(M)_{korr}$ aus Abb. 57 liegen um Faktor 10 überhalb der Intensitäten aus Abb. 58 für die untere Sättigung, für die obere Sättigung ist es wiederum ca. Faktor 10. Zusammen deutet dies auf eine Parallelverschiebung der Kurven. Dies zeigt die Notwendigkeit der Kalibrierung von verschiedenen Produktionsserien von Chips. D. h. für jede neue Serie

sollte zuerst eine Standardkurve erzeugt werden, bevor unbekannte Konzentrationen ermittelt werden können. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle die Wiederbestimmungsrate untersucht. Diese bezeichnet das Messen einer bekannten Konzentration, die anhand einer zuvor gewonnenen Standardkurve bestimmt werden soll. Dieser Fall simuliert somit die Standardsituation eines Point-of-Care-Systems: Die Ermittlung einer unbekannten Konzentration.

Hierzu wird die Standardkurve, also der sigmoidale Fit aus Abb. 58, übernommen, um unbekannte Konzentrationen zu bestimmen. In Abb. 59 werden wiederum Chipreplika desselben Chipsatzes für drei Konzentrationen innerhalb des dynamischen Messbereichs durchgeführt. Wichtig hierbei ist, dass die Probe und die Detektionsantikörper frisch angesetzt sind. So wird die Reproduzierbarkeit der Methode sichergestellt. Für eine positive Wiederbestimmungsrate sollten hierbei nun die Werte für Unpräzision und Unrichtigkeit bei mindestens < 30 % liegen.

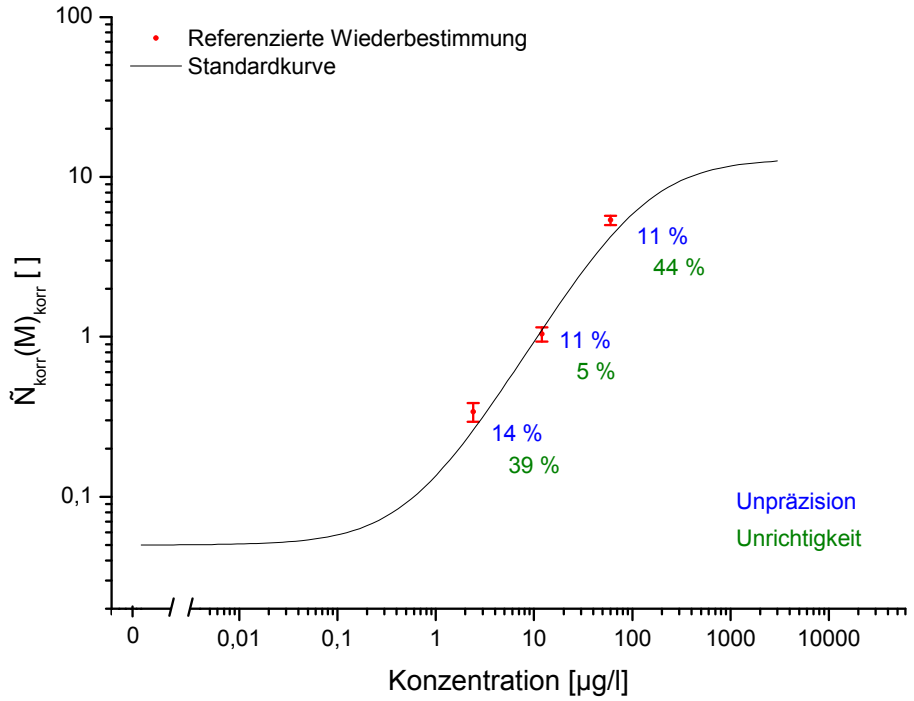


Abb. 59 Wiederbestimmungsrate mit IL-6 in Plasma

Verwendete Reagenzien: Spotting-Referenzantikörper 85 mg/l, Spottingantikörper 300 mg/l für IL-6, Detektions-Referenzantikörper 0,01 mg/l, Detektionsantikörper für IL-6 2 mg/l.

In Abb. 59 ist zu sehen, dass das Replikat bei 12 µg/l die Richtlinien erfüllt. Die Replikate für 2,4 und 60µg/l weisen auch mit < 15 % eine sehr gute Unpräzision auf, sind jedoch mit 39 % bzw. 44 % für die Unrichtigkeit überhalb des zulässigen Grenzwertes. Somit werden also statt 2,4 µg/l 3,33 µg/l, statt 12µg/l 11,4 µg/l und statt 60µg/l 86,4 µg/l gemessen. Grund hierfür können leichte Tendenzen der Chips innerhalb einer Produktionsserie, aber vermutlich vor allem Schwankungen bei der Vorbereitung der

Probe sein. Die IL-6 Antigene liegen in gefrorener Form vor. Es wird darauf hingewiesen Auftau- und Einfrierzyklen zu vermeiden. Diese lassen sich jedoch nicht komplett vermeiden. Zusätzlich müssen zur Probenvorbereitung Stammlösungen pipettiert werden, um die eigentlichen Konzentrationen anzumischen, hierbei können leichte Fehler entstehen, die sich beim weiteren Verdünnen fortpflanzen.

Dennoch kann dieser Versuch als sehr positiv gewertet werden. Die Tendenz der Wiederbestimmungsrate liegt zwar außerhalb der Richtwerte, dennoch reihen sich die Messungen konsistent in die Standardkurve ein. Durch passende Optimierung ist es sehr wahrscheinlich, dass die Grenzwerte auch eingehalten werden können. In Tabelle 16 ist die Wiederbestimmungsrate ohne Referenzierung dargestellt.

Tabelle 16 Wiederbestimmungsrate ohne Referenzierung

Konzentration [µg/l]	Unpräzision [%]	Unrichtigkeit [%]
2,4	84	205
12	58	29
60	47	390

Die Nennwerte für Unpräzision und Unrichtigkeit für die IL-6 Mess-Spots ohne heterogene Referenzierung zeigen deutliche erhöhte und inakzeptable Werte auf. Sie liegen im Mittel für die Unpräzision um Faktor 5,2 und noch wichtiger für die Unrichtigkeit um Faktor 7 über denen der referenzierten Werte. Somit wirkt sich die Referenzierung auch positiv bei der Messung von unbekannten Konzentrationen aus. Eine sehr überzeugende Leistung.

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Unrichtigkeit für die Bestimmung von unbekannten Konzentrationen könnte eine Kalibration sein, eine Handhabe zur Berechnung ist in Gleichung 41 gezeigt.

Gleichung 41 Kalibration der Wiederbestimmungsrate

$$const_{kal} = const_{org} \cdot \frac{\tilde{N}_{korr}(M)_{korr}}{y_{theo}}$$

zu

$$\tilde{N}_{kal}(M)_{korr} = const_{kal} \cdot \frac{\tilde{N}_{korr}(M)_{korr}}{\tilde{N}(ref)}$$

$\tilde{N}_{kal}(M)_{korr}$ = Chip-zu-Chip kalibrierte und korrigierte Intensität eines Chips berechnet aus Spot-zu-Spot korrigierten Werten

$const_{kal}$ = Kalibrierte Konstante zur Referenzierung

$\tilde{N}_{korr}(M)_{korr}$ = Chip-zu-Chip korrigierte Intensität eines Chips berechnet aus Spot-zu-Spot korrigierten Werten

y_{theo} = Theoretischer Wert des Kurvenfits

$const_{org}$ = Original Konstante zur Referenzierung [10]

$\tilde{N}(ref)$ = Median der Intensitäten der Referenz-Spots

Die neue Konstante $const_{kal}$ ist somit bis zur nächsten Änderung der Reagenzien oder des Chipsatzes für jede neue Messung gültig. Die Intensitätswerte der Messungen $\tilde{N}_{kal}(M)_{korr}$ sind nun kalibriert, das Resultat ist in Abb. 60 zu sehen.

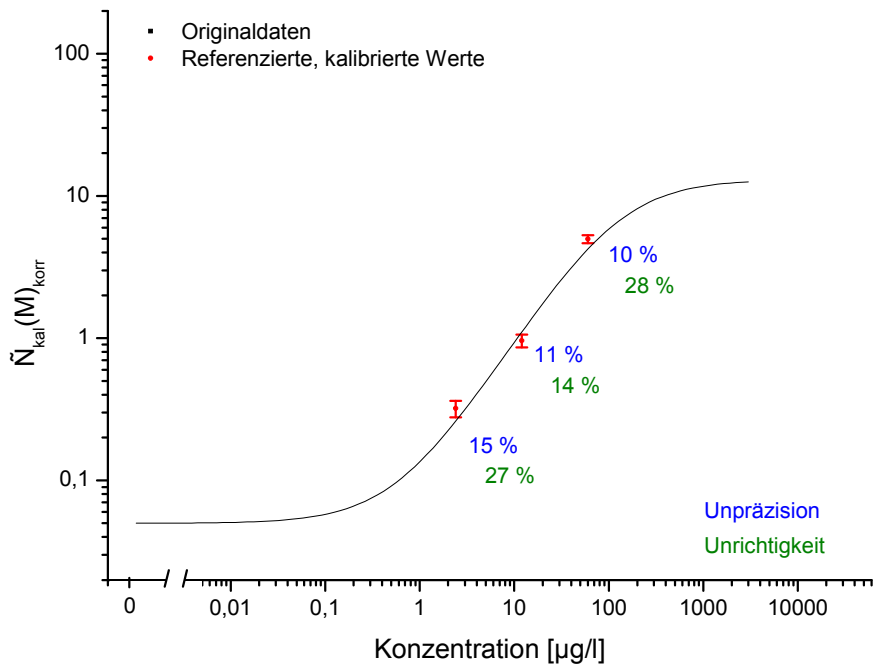


Abb. 60 Kalibrierte Wiederbestimmungsrate mit IL-6 in Plasma

Verwendete Reagenzien: Spotting-Referenzantikörper 85 mg/l, Spottingantikörper 300 mg/l für IL-6, Detektions-Referenzantikörper 0,01 mg/l, Detektionsantikörper für IL-6 2 mg/l.

Durch die Kalibrierung sind nun alle Replika < 30% für die Unrichtigkeit und < 15 % für die Unpräzision, somit akzeptable Werte für eine Wiederbestimmungsrate. Diese Methode muss mit weiteren Messungen verifiziert werden, jedoch scheint eine Kalibration die richtige Methode zum Ausgleich für Variationen beim Anmischen zu sein. Die verwendete Methode kommt einer sogenannten Ein-Punkt-Kalibrierung gleich, für sigmoidale Kurven wird typischerweise eine Vier-Punkt-Kalibrierung durchgeführt.

17.8 Kapazität der Referenzreaktion

Nach den Ergebnissen in den Kapiteln 17.7.1, 17.7.2 und 17.7.3 kann festgehalten werden, dass es möglich ist, eine Großzahl von Fehlern durch die einkanalige homogene und die heterogene Referenzreaktion auszugleichen. Dieses Kapitel soll eingrenzen, an welcher Stelle die Referenzierung greift bzw. welcher Fehler die Hauptursache für die Variation der Test-Signale ist. In Kapitel 16 „Fehlerquellen für das Wellenleitersystem“, Tabelle 9 (S. 91) sind Ursachen von möglichen Fehlern gezeigt. Es ist selbstverständlich kein Zufall, dass diese Aufzählung im Gesamten der Prozessierung eines Biochips bis zum Entstehen des Signals entspricht. Wie bereits erklärt, haben viele der genannten Fehler identische Auswirkung, aber dennoch unterschiedliche Ursachen. Diese Fehler aufzulösen, stellt eine komplexe Herausforderung dar.

Der Fehlereinfluss des Wellenleiterchips ist in Kapitel 16 „Fehlerquellen für das Wellenleitersystem“ beschrieben. Zusammengefasst ist der Wellenleiterchip auch bereits vor der Prozessierung zum Biochip eine Fehlerquelle. Die interne Qualitätskontrolle zeigt einen Fehler der mittleren Ausleuchtung von 15%. Da diese Fehler direkt in die Intensitäten der Referenz-Spots einfließen, werden diese Fehler zu einem großen Anteil ausgeglichen.

Der Fehlereinfluss der Reinigung und Beschichtung der Chips ist nach der dargelegten Optimierung und Charakterisierung in Kapitel 11 „Herstellung von Biochips“ als gering einzuschätzen. Leichte Variationen in der Schichtdicke des Epoxids und der chemischen Funktionalität fließen direkt in das Referenzsignal mit ein und werden somit ausgeglichen. Die Optimierung für das Spotting zeigte eine deutliche Verbesserung der Mikroarrays auf. Trotzdem kann eine fehlerhafte Referenzreaktion durch Fehler im Spotting nicht komplett ausgeschlossen werden. Die heterogene Referenzierung zeigte die besten Ergebnisse mit Hinblick auf das Korrekturvermögen der Daten auf, dennoch durchlaufen die Referenz-Spots gerade für diese Methode einen Spottingprozess, der von den Mess-Spots abgekapselt ist, da die Spots örtlich getrennt liegen.

Die Charakterisierung der Fluidik-Einheit zeigte in Kapitel 16 „Fehlerquellen für das Wellenleitersystem“ Probleme, die durch Varianzen in der Zellhöhe verursacht werden auf. Da diese mit der Diffusionslänge verknüpft sind, können Signalunterschiede durch die Referenzreaktion erfasst und ausgeglichen werden.

Die Charakterisierung der Optik-Einheit lieferte akkurate Reproduzierbarkeit (siehe Kapitel 12.4) für die Koppelfunktion, mit Signalaufnahme und -auswertung von 2,6 % für einen Chip. Für mehrere Chips liegt der Variationskoeffizient von Chip-zu-Chip bei 33 % (Tabelle 15). Durch den Ausgleich der Spot-zu-Spot Varianzen laut Kapitel 17.7.2 kann gezeigt werden, dass die Optik-Einheit nicht für diesen hohen Fehler verantwortlich ist. Da durch die Referenzierung offensichtlich die Streuung der Mess-Spots auf einem Chip verbessert wird, wird somit auch der Mittelwert der Mess-Spots präziser.

Dies hat zur Folge, dass der Variationskoeffizient der Chipreplika im Vergleich zum Original verändert ist. Wenn die Streuung groß genug und asymmetrisch verteilt wäre, könnte dieser Fehler den Variationskoeffizienten für Chipreplika erhöhen. Die Untersuchung hat jedoch das Gegenteil gezeigt: Z. B. ist für eine IL-6 Messung von n = 7 Replika der Variationskoeffizient nach der Spot-zu-Spot Referenzierung von 36 % im Original auf nur 35 % reduziert, obwohl der Spot-zu-Spot Fehler im Mittel von 15 %, bereits ein sehr akzeptabler Wert, auf 12 % reduziert werden konnte (siehe Tabelle 14, S. 111). Somit ist der Fehler der Ausleuchtung, der Dämpfung oder Justierung nicht die Ursache der hohen Chip-zu-Chip Variation, denn diese können durch die Referenzierung ausgeglichen werden.

Die Fehler der Reaktion und der Biochemie (siehe Kapitel 16 „Fehlerquellen für das Wellenleitersystem“) wie Additive in Puffern, Einfluss der Temperatur, Ausrichtung der Antikörper etc. werden zu einem gewissen, nicht quantifizierbaren Anteil durch Referenzreaktion ausgeglichen. Durch die parallele Prozessierung unter identischen Bedingungen und durch die Verwendung von Antikörpern für die Referenzreaktion wird auf Äquivalente zum Immun-Test zurückgegriffen. An dieser Stelle muss auch gesagt sein, dass die Referenzreaktion nicht in der Lage ist, die Funktionalität des Chips aufzulösen. Der spezifische Antikörper der Referenzreaktion ist der Detektionsantikörper in Lösung. Würden durch z. B. schlechte Lagerung der Chips die gespotteten Antikörper der Analyten ihre Funktion verlieren, könnte das Referenzsignal dennoch positiv ausfallen. Grund hierfür ist, dass das Epitop des Spottingantikörpers der Referenz stabiler ist, als das Paratop des spezifischen Detektionsantikörpers. Somit könnten die Antikörper der Analyten funktionsuntüchtig sein, während das Referenzsignal positiv ist. Folglich wäre eine Limitierung der gezeigten Referenzreaktion in Bezug auf die Überprüfung der Chipfunktionalität gegeben.

V Zusammenfassung und Ausblick

18 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte ein Gesamt-System entwickelt werden, das sehr schnell, vollautomatisch und akkurat Multiparameter-Immun-Tests prozessiert und analysiert. Das System setzt sich aus einer Optik-Einheit, Fluidik-Einheit, der Chipherstellung, den Immun-Tests und der Probenvorbereitung zusammen. Die insgesamt vier untersuchten klinischen Parameter sind für die Diagnose von Sepsis relevant und das System wurde für die Detektion dieser Parameter optimiert. Die Kombination der Systemfunktionen mit der entwickelten Referenzierungsmethode erbringt zusätzlich einen sehr akzeptablen Grad an Reproduzierbarkeit. Vor allem mit der heterogenen Referenzierung konnten die gültigen klinischen Anforderungen bezüglich Unpräzision und Unrichtigkeit nahezu vollständig erreicht werden. Die Kombination der genannten Funktionen sind in dieser Arbeit erstmalig auf Basis von Mikroarrays gezeigt worden. So konnte die Grundlage für alle benötigten Funktionalitäten für ein Point-of-Care-System für die Diagnose von Sepsis geschaffen werden.

Die entwickelte Fluidik-Einheit wurde entwickelt und charakterisiert. Die Fluidik-Einheit ist in der Lage die Immunfluoreszenz-Tests für den Nachweis septischer Parameter in humanem Plasma zu prozessieren. Hierbei wurden die fluidischen Funktionen wie Verdünnen, Dosieren, Mischen durch Taylor Dispersion, Vorinkubation und Inkubation implementiert und verifiziert. Das System besteht aus wenigen Komponenten, wie Teflonschläuchen, einem Verteilerventil, einer Spritzenpumpe mit Y-Ventil, einer Blasenfalle und einer Flusszelle, was die Einheit kostengünstig macht. Die Flusszelle erbrachte durch die geringe Zellhöhe von 30 µm sehr schnelle Inkubationszeiten. Ein Ablauf für die gleichzeitige Durchführung von zwei Testformaten wurde entwickelt. Der bindungsinhibitierende und der nicht-kompetitive Test, beide notwendig für den Nachweis von klinischen Parametern, konnten in einen Ablauf implementiert werden. Die Fluidik-Einheit benötigt für den Multi-Test nur 10µl Probenvolumen und jeweils 90 µl bzw. 100 µl an Detektionsantikörpern.

Die Optik-Einheit stand bei Antritt der Arbeit bereits zur Verfügung. Bei Charakterisierung der Optik-Einheit, zur Signalaufnahme der planaren Wellenleiterchips, wurde die hoch-sensitive Detektion von fluoreszierenden Mikroarrays mit der Technik der Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) gezeigt. Der Vergleich mit einem kommerziellen Laserscanner ergab ein ca. 22-fach niedrigeres Detektionslimit von fluoreszierenden Mikrospots, die theoretischen Annahmen ergaben hierbei eine Detektion von 0,037 Fluorochromen/μm^2. Der dynamische Messbereich der Optik-Einheit beträgt drei

Dekaden für die Aufnahme der Fluoreszenzsignale. Der Bereich wird auch erreicht, wenn die Signale nahe am Detektionslimit liegen. Zusammengefasst konnte so festgehalten werden, dass die Optik-Einheit bezüglich der Sensitivität und des dynamischen Messbereichs alle Anforderungen erfüllt, die für die Aufnahme von Multi-Parameter Mikroarrays für Sepsis-Diagnostik benötigt werden.

Die Fluidik-Einheit und die Optik-Einheit wurden in einem System zusammengeführt. Für ein System für Point-of-Care Anwendungen ist es notwendig, den Testablauf und die Signalaufnahme der Mikroarrays vollautomatisch zu prozessieren. Durch die Implementierung von Befehlen in die System-Software konnten die einzelnen Komponenten gesteuert werden. Der Befehlssatz wird einfach und flexibel vom System seriell abgearbeitet. So wurde der Ablauf zur Durchführung der notwendigen fluidischen und optischen Funktionen für Immun-Tests in einem Befehlssatz umgesetzt. Hierbei entstand ein vollautomatischer Ablauf, der sehr reproduzierbar und vom Benutzer unabhängig den gesamten Test innerhalb von ca. 25 Minuten prozessiert und auch analysiert. Somit sind bereits viele wichtige Vorrausetzung für ein Point-of-Care System erfüllt, es ist kompakt, kostengünstig, vollautomatisch, hoch-sensitiv, misst mehrere Parameter gleichzeitig und weist kurze Testzeiten auf. Vor allem die Kombination von Multiparameter-Tests in zwei Testformaten mit der automatischen Prozessierung innerhalb kürzester Zeit übersteigt hier an vielen Stellen den aktuellen Stand der Technik.

Die Durchführung von Multiparameter-Tests wurde mit insgesamt vier klinisch relevanten Parametern gezeigt. So wurden nicht-kompetitive Tests mit IL-6 und PCT gezeigt, die parallel mit bindungsinhibitierenden Tests für das CRP oder NPT prozessiert wurden. Die Funktionalität konnte in Serumersatz und in humanem Plasma gezeigt werden. Durch die Verwendung eines bindungsinhibitierenden Tests für das C-reaktive Protein konnte der klinisch relevante Messbereich abgedeckt werden. IL-6 und PCT konnten mittlere bis stark erhöhte Konzentrationen nachgewiesen werden. Der Konzentrationsbereich für NPT konnte um ca. Faktor 10 nicht aufgelöst werden. Generell waren alle Parameter zum Großteil über dem Grenzwert von 15 % für die Unrichtigkeit und Unpräzision. Da diese Grenzwerte für klinische Systeme vorgeschrieben sind, musste die Reproduzierbarkeit der Test-Signale verbessert werden. Die mangelnde Reproduzierbarkeit ist ein generelles Problem von Immun-Tests auf Basis von Mikroarrays.

Aus diesem Grunde wurden drei Referenzierungsmethoden getestet, die mittels einer Referenzreaktion die Unpräzision und die Unrichtigkeit der Tests stark verbessern sollten. Die Idee dahinter ist, dass eine Referenzreaktion, die parallel mit dem eigentlichen Immun-Test prozessiert wird, eine Vielzahl von Fehlern des Gesamtsystems im Signal enthält. Somit kann das Referenzsignal mit dem Messsignal verrechnet werden und Fehler von der Chipherstellung, Fluidik-Einheit, Optik-Einheit und Immunreaktion ausgleichen.

Bei der homogenen Referenzierung befinden sich die Spotting-Referenzantikörper mit den Spottingantikörpern der Analyten in einem Spot. Die einkanalige Referenzierung verwendet denselben Fluoreszenzfarbstoff für den Detektions-Referenzantikörper wie die Detektionsantikörper der Analyten. Die zweikanalige homogene Referenzierung verwendet hierfür einen Farbstoff, der bei gleicher Anregung bei höherer Wellenlänge emittiert. Die dritte Variante ist die heterogene Referenzierung, bei der die Spotting-Referenzantikörper benachbart zu den Spottingantikörpern der Analyten angeordnet sind. Alle drei Varianten zur Referenzierung wurden umfangreich untersucht.

Nach der Untersuchung der Teilaspekte zur Ursache der Verbesserung der Datensätze durch Referenzierung konnten die Fehler lokalisiert und festgehalten werden, an welcher Stelle die Referenzreaktion greift. Fehler im Wellenleiterchip, wie Inhomogenitäten im optischen Gitter oder Variationen in den Wellenleiterschichtdicken, werden zum Großteil durch die Referenzierung ausgeglichen. Die Oberflächenmodifizierung mit Epoxidharz ist reproduzierbar, dies wird durch die geschilderten Maßnahmen bei der Herstellung sichergestellt. Somit ist dieser Fehlereinfluss als gering einzuschätzen. Im Gegensatz dazu ist der Fehlereinfluss des Spottings als hoch einzuschätzen. Diese Fehler vom abgegebenen Spotvolumina und Variationen der Spotmorphologien stören die Funktion der Referenzierung und der Tests, der Fehler kann nicht ausgeglichen werden und verursacht eine drastische Verschlechterung des Datensatzes. Maßnahmen für die Erhaltung konstanter Raumklimabedingungen und optimierter Einstellung beim Spotting sind effektive Gegenmaßnahmen. Die Fehler der Fluidik-Einheit sind durch Blasen in der Reaktionskammer verursacht oder durch inkorrektes Anpressen der Flusszelle. Blasen werden vom System erkannt und variierende Signale durch unterschiedliche Zellhöhen werden durch die Referenzreaktion zum Großteil ausgeglichen. Die Fehler der Optik-Einheit erbrachten geringe Fehler von nur 2,6 % für die Koppelfunktion mit Signalaufnahme und Auswertung. Als letzter Fehlereinfluss wurden die Reaktion und Biochemie geprüft. Durch die diversen Reagenzien und deren Additive ist der Einfluss auf die Signalentstehung als sehr hoch einzuschätzen. Dieser Fehler ist nicht quantitativ aufzulösen. Jedoch sind viele der Auswirkungen, wie z. B: Reaktionskinetik, Einfluss der Additive, etc., in der Referenzreaktion enthalten und werden durch die parallele Prozessierung und den hohen Äquivalenzgrad zum Immun-Test mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeglichen.

Die effektivste der Referenzmethoden ist die heterogene Referenzierung. Spot-zu-Spot wurden die Varianzen von 15 % ± 5 % im Original auf 12 % ± 6 % verbessert, wobei die Datenmenge zu 88 % verbessert wurde. Auch Chip-zu-Chip-Varianzen wurden für NPT von 27 % ± 16 % auf 14 % ± 10 % verbessert, die IL-6 und PCT Replikatsmessungen wurden von 32 % ± 17 % auf 14 % ± 8% verbessert. Die Untersuchung mit Standardkurven wurde für IL-6 und NPT vertieft. Die Standardkurven beider Parameter zeigten eine erhebliche Verbesserung der Unpräzision und Unrichtigkeit, im Mittel um ca. Faktor 3,5. Für IL-6 wird die Unpräzision mit Hilfe der heterogenen Referenzierung

bei 80 % der Chips gegenüber den Originalwerten verbessert. 100% des Chipsatzes entspricht 45 dreifachen Replikatsmessungen, also 135 Chips. Ohne Referenzierung liegt die Unpräzision nur bei 13 % der Chipsätze unter dem Grenzwert von 15 %, mit Referenzierung wird bei 38 % der Chipsätze ein Wert unter 15 % erreicht. Dieser Wert wird auf 66 % erhöht für Grenzwerte < 25%. Die Referenzierung verbessert auch die Unrichtigkeit zu 71 %, so liegt die Unrichtigkeit bei 49 % der Chipsätze unter 15 %. Die Originalwerte liegen ohne Referenzierung nur zu 33 % unter dem Grenzwert. Die Referenzreaktion beeinflusst den Test nicht. Die Detektionslimits und der dynamische Messbereich wurden zusätzlich durch diese Referenzierungsmethode verbessert bzw. nicht negativ beeinflusst. Die Funktionalität konnte auch in humanem Plasma gezeigt werden. Hier wurden Detektionslimits mit zwei Standardkurven mit 0,1 und 0,5 µg/l für das IL-6 erreicht und die insgesamt sechs Replika lagen im dynamischen Bereich mit < 23 % für Unpräzision und mit < 11 % Unrichtigkeit sehr akkurat. Auf Grund der 1:10 Verdünnung detektiert das Gerät also, wie in mehreren Standardkurven ermittelt wurde, 0,01-0,05 µg/l des gesuchten Proteins, ein sehr überzeugender Wert. Auch die Wiederbestimmungsrate konnte ermittelt werden. Diese liegt z. T. über den Vorgaben der Richtlinien, dennoch erbringt sie den Beweis für die Funktion der gesamten Methode. Nach Kalibration dieser Werte wurde die Unrichtigkeit auf < 30 % verbessert.

Zusammen mit dem vollintegrierten WLS ermöglicht die heterogene Referenzierung eine akkurate Analyse von klinischen Parametern in humanem Plasma, welche vollautomatisiert und hochsensitiv innerhalb von nur 25 Minuten erfolgt.

19 Ausblick

Das entwickelte Point-of-Care-System bedarf vor einem uneingeschränkten Einsatz auf der technischen Seite vor allem einer Optimierung der Chipherstellung. Das beinhaltet die Produktion der Wellenleiterchips selbst, sowie die Prozesse der Oberflächenfunktionalisierung und im Speziellen das Spotting. Wenn hier eine konstante Qualität über Chipserien hinweg erhalten werden kann, ermöglicht die heterogene Referenzierung die Möglichkeit zu einer vollständig positiven technischen Validierung des Systems. Das Erreichen dieser hohen Qualität benötigt einen erhöhten messtechnischen Aufwand während der Chipproduktion, um schon vorab prozessinterne Qualitätskontrollen zu implementieren. Hierbei sollten auch weitere Referenzen innerhalb des Chips bzw. des Mikroarrays implementiert werden, um z. B. die Funktionalität der gespotteten Sonden zu gewährleisten.

Des Weiteren sollten geeignete Methoden zur Kalibrierung verschiedener Chipserien untersucht werden. Die Übereinstimmung der Standardkurven zwischen verschiedenen Chipserien weisen noch zu hohe Abweichungen auf. Durch geeignete Messungen mit Standardlösungen könnten hier jedoch, wie auch sehr häufig für klinische Geräte

angewandt, die Systeme kalibriert werden. Als Beispiel könnte eine Vier-Punkt-Kalibration dienen. Hierbei wird durch wenige Messpunkte eine sigmoidale Kurve aufgenommen, mit der das Gerät kalibriert werden kann. Eine solche oder ähnlich geeignete Methoden müssten ermittelt und untersucht werden.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit zur Optimierung des Messbereichs und des Detektionslimits der klinischen Parameter. Dies könnte durch die Reduktion des Verdünnungsfaktors erreicht werden. Der Faktor in der Arbeit ist mit einer Verdünnung von 1:10 ausreichend hoch eingestellt, um Matrixeffekte zu unterbinden. Durch einen Verdünnungsfaktor von z. B. 1:2 könnte das Detektionslimit also 5-fach sensitiver werden. So könnten IL-6, PCT und NPT den klinisch relevanten Bereich verbessern bzw. vollständig abdecken. Es gilt hierbei das Optimum zwischen Sensitivität und dem Einfluss von Matrixeffekten zu finden. Auch die Verwendung anderer monoklonaler Spotting- und Detektionsantikörper könnten hierbei helfen, dieses Ziel zu erreichen.

20 Anhang

20.1 Quellenverzeichnis

[1] S. Tallia, J. E. Kunicka, Sepsis: Improving the odds, Siemens: Diagnostic Trends, Perspectives - Spring 2009, (2009), pp. 6-11.

[2] G. J. Kost, S. S. Ehrmeyer, B. Chernow, J. W. Winkelman, G. P. Zaloga, R. R. Dellinger, T. Shirey, The laboratory-clinical interface - Point-of-care testing, Chest, Vol. 115, No. 4, (1999), pp. 1140-1154.

[3] G. Gauglitz, P. B. Luppa, Point-of-care Laboratory Testing, Chemie in unserer Zeit, Vol. 43, No. 5, (2009), pp. 308-318.

[4] F. M. Brunkhorst, W. Karzai, K. Reinhart, Diagnostic Approach to Sepsis - State of the Art, Zentralblatt für Chirurgie, Vol. 127, No. 3, (2002), pp. 165-173.

[5] Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis, 1. Revision der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI), (2010).

[6] C. Mitaka, Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome, Clinica Chimica Acta, Vol. 351, (2005), pp. 17-19.

[7] D. Fuchs, C. Stahl-Hennig, A. Gruber, C. Murr, G. Hunsmann, H. Wachter, Neopterin--its clinical use in urinalysis, Kidney Int Suppl, Vol. 47, (1994), pp. 8-11.

[8] E. A. Panacek, M. Kaul, IL-6 as a Marker of Excessive TNF-α Activity in Sepsis, Sepsis, Vol. 3, No. 1, (1999), pp. 65-73.

[9] G. Holländer, "Immunologie" Vol. 1. edition, ELSEVIER Urban & Fischer, (2006).

[10] J. Schröder, K.-H. Staubach, P. Zabel, F. Stüber, B. Kremer, Procalcitonin as a marker of severity in septic shock, Langenbeck's Arch Surg, Vol. 384, (1999), pp. 33–38.

[11] S. Black, I. Kushner, D. Samols, C-reactive protein, JBC Papers, Vol. 279, No. 4, (2004), pp. 48487-48490.

[12] M. Kemmler, B. Koger, G. Sulz, U. Sauer, E. Schleicher, C. Preininger, A. Brandenburg, Compact Point-of-Care System for Clinical Diagnostics, Sensors and Actuators B, Vol. 139, No. 1, (2009), pp. 44-51.

[13] M. B. Pepys, G. M. Hirschfield, C-reactive protein: a critical update, J. Clin. Invest, Vol. 111, No. 12, (2003), pp. 1805-1812.

[14] Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, (2001).

[15] Bundesärztekammer, Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen, Deutsches Ärzteblatt, Vol. 98, No. 42, (2001), pp. A 2747 - 2759.

[16] S. Dübel, P. Rohrbach, A. Schmiedl, Rekombinante Antikörper, Biologie in unserer Zeit, Vol. 34, No. 6, (2004), pp. 372-379.

[17] D. Nelson, M. Cox, "Lehninger Biochemie", Berlin, Springer-Verlag, (2001).

[18] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, "Molekularbiologie der Zelle" Vol. 2, VCH Verlagsgesellschaft mbH, (1994).

[19] M. Biesalski, Vorlesung: Biomaterialien II, Institut für Mikrosystemtechnik, (2008).

[20] D. Wild, "The Immunoassay Handbook", second edition, London, Nature Publishing Group, (2001).

[21] H. J. Müller, T. Röder, "Der Experimentator: Microarrays", Heidelberg, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, (2004).

[22] R. Zengerle, A. Klocke, T. Metz, Diffusion, Surface Tension, Vorlesung Mikrofluidik 1, (2007).

[23] I. Barbulovic-Nad, M. Lucente, Y. Sun, M. Zhang, A. R. Wheeler, M. Bussmann, Bio-Microarray Fabrication Techniques—A Review, Critical Reviews in Biotechnology, Vol. 26, No. 4, (2006), pp. 237–259.

[24] M. Schena, "Microarray Biochip Technology", 1. Edition, Eaton Publishing Company/Biotechniques Books, (2000).

[25] C. Preininger, U. Sauer, J. Dayteg, R. Pichler, Optimizing processing parameters for signal enhancement of oligonucleotide and protein arrays on ARChip Epoxy, Bioelectrochemistry, Vol. 67, (2005), pp. 155 – 162.

[26] C. Preininger, L. Bodrossy, U. Sauer, R. Pichler, A. Weilharter, ARChip Epoxy and ARChip UV for covalent on-chip immobilization of pmoA gene-specific oligonucleotides, Analytical Biochemistry, Vol. 330, (2004), pp. 29–36.

[27] Patent: Österreichisches Forschungszentrum Seibersdorf, (2001): Epoxy resin for biochips, AT500.669.

[28] J. W. A. Findlay, R. F. Dillard, Appropriate Calibration Curve Fitting in Ligand Binding Assays, The AAPS Journal Vol. 9, No. 2, (2007), pp. E260-E267.

[29] J. Pultar, U. Sauer, P. Domnanich, C. Preininger, Aptamer-antibody on-chip sandwich immunoassay for detection of CRP in spiked serum, Biosensors & Bioelectronics, Vol. 24, No. 5, (2009), pp. 1456-1461.

[30] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, "Biochemie", Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag, (2003).

[31] F. Lottspeich, H. Zorbas, "Bioanalytik", Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, (1998).

[32] G. Adam, P. Läuger, G. Stark, "Physikalische Chemie und Biophysik", 4. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York, Springer, (2003).

[33] Datasheet: Alexa Fluor Succinimidyl Esters, Molecular Probes, Invitrogen, (2009).

[34] H. Kuchling, "Taschenbuch der Physik;" München, Wien, Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag, (2001).

[35] H. Lindner, "Physik für Ingenieure", 16. Auflage, München, Wien, Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag, (2001).

[36] A. Brandenburg, Optische Mikrosensoren, Vorlesung IMTEK, (2009).

[37] T. Tamir, "Guided-Wave Optoelectronics", Berlin Heidelberg, Springer Verlag (1998).

[38] D. Axelrod, T. P. Burghardt, N. L. Thompson, Total Internal Reflection Fluorescence, Annu. Rev. Biophys. Bioeng., Vol. 13, (1984), pp. 247-268.

[39] D. Axelrod, E. H. Hellen, R. M. Fulbright, Total Internal Reflection Fluorescence, Topics in Fluorescence spectroscopy, Vol. 3, (1992).

[40] H.-P. Lehr, M. Reimann, A. Brandenburg, G. Sulz, H. Klapproth, Real time detection of nucleic acid interactions by total internal reflection fluorescence, Analytical Chemistry, Vol. 75, (2003), pp. 2414-2420.

[41] C. A. Rowe, S. B. Scruggs, M. J. Feldstein, J. P. Golden, F. S. Ligler, An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes, Anal. Chem. , Vol. 71 (1999), pp. 433 - 439.

[42] W. Budach, A. Apel, A. Bruno, D. Neuschäfer, Planar waveguideas high-performance sensing platforms for fluorescence-based multiplexed oligonucleotide hybridisation assays, Analytical Chemistry, Vol. 71, (1999), pp. 3347-3355.

[43] G. Duveneck, M. Pawlack, D. Neuschäfer, E. Bär, W. Budach, U. Pieles, M.Ehrat, Novel bioaffinity sensors for trace analysis based on luminescence excitation by planar waveguides, Sensors and Actuators B, Vol. 38, (1997), pp. 88-95.

[44] P. Pawlak, E. Schick, M. A. Bopp, M. J. Schneider, P. Oroszlan, M. Ehrat, Zeptosens´ protein microarrays: A novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis, Proteomics, Vol. 2, (2002), pp. 383-393.

[45] E.-H. Lee, R. E. Benner, J. B. Fenn, R. K. Chang, Angular distribution of fluorescence from liquids and monodispersed spheres by evanescent wave excitation, Applied Optics, Vol. 18, No. 6, (1979), pp. 862-868.

[46] R. Blue, N. Kent, L. Polerecky, H. McEvoy, D. Gray, B. D. MacCraith, Platform for enhanced detection efficiency in luminescence-based sensors, Electron. Lett. , Vol. 41, No. 12, (2005), pp. 682–684.

[47] L. Polerecki, J. Hamrle, B. D. MacCraith, Theory of the radiation of dipoles placed within a multilayer system, Applied Optics, Vol. 39, No. 22, (2000), pp. 3968-3977.

[48] F. Pedrotti, L. Pedrotti, W. Bausch, H. Schmidt, "Optik für Ingenieure", 2. edition, Springer, (2002).

[49] E. Hecht, "Optik", Vol. 1, Addison-Wesley Publushing Company, (1989).

[50] D. Janssen, R. D. Palma, S. Verlaak, P. Heremans, W. Dehaen, Static solvent contact angle measurements, surface free energy and wettability determination of various self-assembled monolayers on silicon dioxide, Thin Solid Films, Vol. 515, (2006), pp. 1433–1438.

[51] L. Papula, "Mathematische Formelsammlung", 10. Auflage, (2009).

[52] S. D. Silbernagl, Agamemnon, "Taschenatlas der Physiologie", Stuttgart, Georg Thieme Verlag, Deutscher Taschenbuchverlag, (2001).

[53] K. Sugano, H. Yamada, O. Ichihashi, T. Tsuchiya, O. Tabata, Fabrication of gold nanoparticle using pulsed mixing method with valveless micropumps, Proc. of IEEE MEMS 2006, (2006), pp. 546-549.

[54] G. I. Taylor, Diffusion and Mass Transport in Tubes, Proc. Phys. Society, section B, Vol. 67, No. 420, (1954), pp. 857-869.

[55] R. C. Bone, R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein, W. J. Sibbald, Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine, Chest, Vol. 101, (1992), pp. 1644-1655.

[56] Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis, 1. Revision der S 2k Leitlinie: Methodenreport, Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V., DVIV, (2010).

[57] J. L. Vincent, Y. S. C. L. Sprung, V. M. Ranieri, K. Reinhart, H. Gerlach, R. Moreno, J. Carlet, J. R. L. Gall, D. P. D, Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study, Crit Care Med., Vol. 34, No. 2, (2006), pp. 344-353.

[58] "A resource for studying biological macromolecules," RCSB PDB, protein data bank: http://www.rcsb.org, 2009.

[59] D. Fuchs, "Neopterin - Den Aktivierungsgrad des Immunsystems erfassen", 2. Auflage, BRAHMS, (2008).

[60] SOP: Klinische Paramter, Zentrallabor, Abt. Med. IV, Vol. 28.12.2009, (2010).

[61] E. Ehrentreich-Förster, D. Andresen, Market potential of point-of-care testing, J. Lab. Med., Vol. 33, No. 3, (2009), pp. 153-157.

[62] Microarray scanners, Lab Times, Vol. 3, (2006), pp. 52-53.

[63] D. J. Cahill, C. Hüls, A. Lueking, H. E. Meyer, Martübersicht, Biospektrum, Vol. 06, No. 9. Jahrgang, (2003).

[64] P. K. Tan, T. J. Downey, E. L. Spitznagl, P. Xu, D. Fu, D. S. Dimitrov, R. A. Lempicki, B. M. Raaka, M. C. Cam, Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms, Nucleic Acids Research, Vol. 31, No. 19, (2003).

[65] W. Nietfeld, Comparability ofMicroarray Experiments from the Instrument and the Sample Site and Approaches Towards Standardization, Springer Ser Fluoresc, Vol. 6, No. 239–263, (2008).

[66] L. Shi, F. M. Goodsaid, F. W. Frueh, W. Tong, Microarray Technology: Unresolved Issues and Future Challenges from a Regulatory Perspective, Ser Fluoresc, Vol. 6, (2008), pp. 265–282.

[67] S. Zou, H.-J-He, Y. Zong, L. Shi, L. Wang, DNA Microarrays: Applications, Future Trends, and the Need for Standardization, Ser Fluoresc, Vol. 6, (2008), pp. 215–237.

[68] C. Maercker, Protein Arrays and Fluorescence Detection: Applications and Limitations, Ser Fluoresc, Vol. 6, (2008), pp. 283-304.

[69] O. Gul, E. Inceturkmen, O. Kutuk, H. Basaga, U. Sezerman, Y. Gurbuz, Biosensor Implementation for Cardiovascular Risk Marker Analysis, Sensors, 2005 IEEE, (2005).

[70] O. Gul, U. Sezerman, H. Basaga, Y. Gurbuz, Sandwich-type, antibody microarrays for the detection and quantification of cardiovascular risk markers, Sensors and Actuators B, Vol. 125, No. 2, (2007), pp. 581-588.

[71] M. Wolf, D. Juncker, B. Michel, P. Hunziker, E. Delamarche, Simultaneous detection of C-reactive protein and other cardiac markers in human plasma using micromosaic immunoassays and self-regulating microfluidic networks, Biosensors & Bioelectronics, Vol. 19, No. 10, (2004), pp. 1193-1202.

[72] C. Albrecht, N. Kaeppel, G. Gauglitz, Two immunoassay formats for fully automated CRP detection in human serum, Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 391, No. 5, (2008), pp. 1845-1852.

[73] F. Baldini, L. Bolzoni, A. Giannetti, G. Porro, F. Senesi, C. Trono, A fluorescent immunoassay for the determination of procalcitonin and C-reactive protein, Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering, (2009), pp. 735613 (8 pp.).

[74] P. Domnanich, U. Sauer, J. Pultar, C. Preininger, Protein microarray for the analysis of human melanoma biomarkers Sensors and Actuators B: Chemical, Vol. 139, No. 1, (2009), pp. 2-8.

[75] Y. Suzuki, K. Hatano, S. Kanaya, S. Uemura, Normalization of Target Fluorescence Using Reference Fluorescence for cDNA Microarray Method, Genome Informatics, Vol. 14, (2003), pp. 338-339.

[76] J. Schuchhardt, D. Beule, A. Malik, E. Wolski, H. Eikhoff, H. Lehrach, H. Herzel, Normalization strategies for cDNA microarrays, Nucleic Acids Research, Vol. 28, No. 10, (2000), pp. E47.

[77] Patent: M. G. J. v. Beuningen, PamGene, United States Patent Application Publication, (2005): Normalisation of microarray data based on hybridisation with an internal reference, US 2005/0153290 A1, WO 2003/054551, EP 1 459 075 B1.

[78] E. V. Konovalova, E. N. Savvateeva, E. I. Dementieva, M. A. Filippova, A. Y. Turygin, T. V. Osipova, T. P. Ryabykh, A. Y. Rubina, A. S. Zasedatelev, Development of a Biochip with an Internal Calibration Curve for Quantitating Two Forms of the Prostate-Specific Antigen, Molecular Biology, Vol. 41, No. 4, (2007), pp. 665-669.

[79] C. Loebke, H. Sueltmann, C. Schmidt, F. Henjes, S. Wiemann, A. Poustka, U. Korf, Infrared-based protein detection arrays for quantitative proteomics, Proteomics, Vol. 7, No. 4, (2007), pp. 558-564.

[80] Patent: P. Reddy, K. Brillhart, F. B. Faroqui, D. A. Keys, B. Coulter, Europäisches Patent Amt, (2004): Reducing microarray variation with internal reference spots, EP 1 625 233 A1, WO 2004/104230 A1, 2007/EP 1 625 233 B1.

[81] P. Oswald, Immobilisierung von Liposomen und der H+-ATPsynthase an Grenzflächen, Thesis, Universität Freiburg, (2006).

[82] Patent: L. Polerecky, B. D. MacCraith, PCT Patent Application, (2002): A luminescence based sensor, WO 02/059583 Al.

[83] S. Lott, Analyse und Optimierung von Fluoreszenzsignalen für die Biochiptechnologie, Diplomarbeit am Fraunhofer IPM, (2010).

[84] A. Abbasian, S. R. Ghaffarian, N. Mohammadia, D. Fallahi, The contact angle of thin-uncured epoxy films: thickness effect, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, Vol. 236, (2004), pp. 133–140.

[85] M. Kemmler, S. Lott, B. Schwarz, U. Sauer, E. Schleicher, C. Preininger, A. Brandenburg, Poster: Sepsis diagnostics for point-of-care application, Europtrode X, (2010, Prag).

20.2 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 17 Abkürzungen

A	Absorption
CRP	C-reaktives Protein
F	Fluoreszenz
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSA	PBS mit 4 % Humanalbumin
IC	Strahlungslose Umwandlung
Ig	Immunglobulin
IL-6	Interleukin-6
LLOQ	Untere Quantifizierungsgrenze
LOD	Detektionslimit
N(M)	Mess-Spots
N(ref)	Referenz-Spots
NPT	Neopterin
NWG	Nachweisgrenze
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCT	Procalcitonin
POCT	Point-of-Care-Testing
PSA	Prostataspezifisches Antigen
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
S_x	Energiezustände
TE	Transversal-elektrisch
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
TTAT	Therapeutic-Turn-Around-Time
ULOQ	Obere Quantifizierungsgrenze
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen
w/w	Verhältnis Gewicht zu Gewicht
WLS	Wellenleiterfluorometer

20.3 Veröffentlichungen

Folgende Veröffentlichungen wurden im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen durchgeführt:

Papers:
M. Kemmler, B. Koger, G. Sulz, U. Sauer, E. Schleicher, C. Preininger, A. Brandenburg, Compact Point-of-Care System for Clinical Diagnostics, Sensors and Actuators B, Vol. 139, No. 1, (2009), pp. 44-51.

Poster:
M. Kemmler, B. Koger, G. Sulz, U. Sauer, E. Schleicher, C. Preininger, A. Brandenburg, Compact Point-of-Care System for Clinical Diagnostics, Europtrode IX, Dublin 2008.

Manuel Kemmler, Birgit Koger, Gerd Sulz, Ursula Sauer, Erwin Schleicher, Claudia Preininger, Albrecht Brandenburg, Multi parameter point-of-care system for sepsis diagnostics, Deutsches BioSensor Symposium, Freiburg 2009.

Manuel Kemmler, Steffen Lott, Barbara Schwarz, Ursula Sauer, Erwin Schleicher, Claudia Preininger, Albrecht Brandenburg, Sepsis diagnostics for point-of-care application, Europtrode X, Prag 2010

20.4 Liste der Substanzen

Tabelle 18 Liste verwendeter Substanzen

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Ethanol 96 % vergällt	Roth, Karlsruhe
Epon Resin SU-8	Hexion, Rotterdam, Niederlande
3(-2-Aminoethylamino)-propyltrimethoxysilan	Sigma-Aldrich, München
Methyl-ethyl-keton	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid 99,5%	Sigma-Aldrich, München
Phosphat buffered saline (PBS) 10x, 0013-016	Invitrogen, Karlsruhe
Low cross buffer, 100 125	Candor, Weißensberg
Natriumdeoxycholat, D67570-10G	Sigma-Aldrich, München
Tween 20, P1379	Sigma-Aldrich, München
Plasma	Uniklinik Tübingen
Sepsis-Indikatoren	
Procalcitonin, HOR-304	Prospecbio, Rehovot, Israel
Interleukin-6, 14-8069	eBioscience, San Diego, USA
C-reaktives Protein (CRP), A97201H	Meridian Lifescience, Saco, USA
D-(+)-Neopterin, 360260	Sigma-Aldrich, München
Spotting	
Antikörper Procalcitonin, PROC1 3G3	Helmholtz-Zentrum, München
Antikörper Interleukin-6 MQ2-13A5, No 14-7069	eBioscience, San Diego, USA
C-reaktives Protein (CRP), A97201H	Meridian Lifescience, Saco, USA
Neopterin	Veterinary Research Institute, Brno, Tschechien
Detektionsantikörper	
Detektionsantikörper Procalcitonin PROC4 6B2	Helmholtz-Zentrum, München, markiert mit DY-647 von Exbio, Vestec, Tschechien
Detektionsantikörper Interleukin-6 MQ2-39C3	eBioscience, San Diego, USA, markiert mit DY-647 von Exbio, Vestec, Tschechien

Fortsetzung Tabelle 18

Detektionsantikörper C-reaktives Protein clone 5	Exbio, Vestec, Tschechien, mit DY-647 markiert
Alexa Fluor® 647 carboxylic acid, succinimidyl ester, 1 mg, A-20006	Invitrogen, Karlsruhe
Detektionsantikörper Neopterin	Veterinary Research Institute, Brno, Tschechien, Dy 647 markiert von Exbio, Vestec, Tschechien
Referenzantikörper	
Normal rabbit IgG (Spotting), 10500C	Invitrogen, Karlsruhe
Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647 (Detektion), Cat. No. A-21245	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Rabbit Alexa Fluor 700, Cat. No. A-21038	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Rabbit Alexa Fluor 750	Invitrogen, Karlsruhe
APC Dy7	Exbio, Vestec, Tschechien