

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier DIN ISO 9706.



**Isoelektrische Fokussierung  
biologischer Systeme mit  
Fluoreszenzdetektion im  
miniaturisierten  
Frei-Fluss-Elektrophorese-Chip**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
Fakultät für Physik  
Universität Bielefeld

vorgelegt von  
Britta Walowski  
aus Göttingen

29. November 2013

Gutachter:  
Prof. Dr. Markus Sauer  
Prof. Dr. Thomas Huser

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1. Elektrophoretische Analytik in der chip-basierten Mikrofluidik . . . . .	5
2.2. Elektrohydrodynamik . . . . .	8
2.2.1. Modell der Doppelschicht an Grenzflächen . . . . .	9
2.2.2. Elektrokinetische Effekte . . . . .	10
2.3. Grundlagen und Theorie der Elektrophorese . . . . .	10
2.3.1. Das Prinzip der Elektrophorese . . . . .	10
2.3.2. Theorie der Elektrophorese . . . . .	12
2.3.3. Betriebsmodi der Elektrophorese . . . . .	16
2.4. Biophysikalische Grundlagen . . . . .	23
2.4.1. Struktur und Konformation der Proteine . . . . .	23
2.4.2. Struktur und Konformation der Nukleinsäuren . . . . .	27
2.4.3. Pufferchemie . . . . .	30
2.5. Grundlagen der Immunoassays und ihre Methoden . . . . .	31
2.5.1. Struktur und Funktion der Antikörper . . . . .	34
2.5.2. Das Antigen . . . . .	40
2.5.3. Häufig verwendete Immunoassays . . . . .	43
2.5.4. ELISA-Systeme . . . . .	46
2.5.5. Fluoreszenz-Immunoassay . . . . .	53
<b>3. Methoden und experimenteller Aufbau</b>	<b>55</b>
3.1. Grundlagen der Fluoreszenz . . . . .	55
3.1.1. Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	58
3.1.2. Fluoreszenzdetektion mit der EMCCD-Kamera . . . . .	61
3.2. Konstruktion des miniaturisierten Frei-Fluss-Elektrophorese-Chips . . . . .	63
3.3. Experimenteller Aufbau . . . . .	69
3.3.1. Verwendete Proteine, Nukleinsäuren und Immunglobuline . . . . .	72
<b>4. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1. Charakterisierung des Detektionssystems . . . . .	77
4.2. Parameter der isoelektrischen Fokussierung im $\mu$ FFE-Chip . . . . .	79
4.3. Isoelektrische Fokussierung von Proteinen und Nukleinsäuren . . . . .	105
4.4. Isoelektrische Fokussierung von Strep-Tactin®/GFP . . . . .	108

## Inhaltsverzeichnis

4.5. Durchführung eines Immunoassays im $\mu$ FFE-Chip . . . . .	110
4.5.1. Isoelektrische Fokussierung von Immunglobulinen . . . . .	110
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>113</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>115</b>

# 1. Einleitung

Im Zuge der intensiven Forschung und der rasanten Entwicklung im Bereich der medizinischen Diagnostik gewinnen die sogenannten *Life-Sciences* immer mehr an Bedeutung. Hierbei gilt es, die Abläufe im menschlichen Organismus bis ins Detail zu erforschen und zu verstehen, um Therapien gegen Krankheiten entwickeln zu können. Für die Bestimmung des Gesundheitszustandes werden Biomarker herangezogen. Bei ihnen handelt es sich um charakteristische biologische Einheiten (z. B. Zellen, Gene, Proteine, Hormone), die Hinweise auf einen pathologischen Vorgang im Organismus geben und gleichzeitig objektiv messbar sind. Eine besondere Rolle beim Aufspüren von diversen Molekülen spielen dabei Separation und Konzentrierung, die es ermöglichen kleinste Probenmengen isoliert zu analysieren.

Die Frei-Fluss Elektrophorese (FFE) ist eine sehr vielseitige Technik, um verschiedene geladene Analyte in wässriger Lösung zu separieren, wie z. B. niedermolekulare anorganische und organische Komponenten, Proteine, Membranen und Organellen bis hin zu ganzen Zellen [1]. Seit ihrer Erfindung im Jahr 1950 hat sich die FFE ständig weiterentwickelt und vor allem im Zuge ihrer Miniaturisierung als effektives Trennverfahren etabliert. Es handelt sich um eine trägerfreie kontinuierliche Methode, bei der der Analytstrom von einem Puffermedium umgeben ist und durch einen flachen Trennkanal fließt. Ein elektrisches Feld wird dabei senkrecht zur Strömungsrichtung angelegt, so dass Gemische geladener Teilchen aufgetrennt werden können. Die drei am häufigsten verwendeten Betriebsarten sind die Frei-Fluss Zonenelektrophorese (FFZE), die Frei-Fluss Isoelektrische Fokussierung (FFIEF) und die Frei-Fluss Isotachophorese (FFITP). Die Methode der FFE findet erfolgreiche Anwendung bei präparativen und analytischen Fragestellungen in Bereichen der Chemie und Biochemie. So wurde unter anderem Blutplasma mittels FFE untersucht, um umfassende Informationen über das hochkomplexe menschliche Proteom zu erhalten [2, 3]. Aufgrund der kontinuierlichen Probenzufuhr und Analytseparation ist eine Online-Detektion und Online-Überwachung verschiedener Analyte simultan möglich.

In der Bioanalytik nehmen Immunoassays eine wichtige Rolle beim Nachweis spezifischer Moleküle ein. Sie finden Anwendung in Krankenhäusern, der Labormedizin und der Forschung, um die Gesundheit und das Wohlbefinden der Menschen zu sichern und stetig zu verbessern. Durch klinische Immunoassays gewonnene Informationen können Krankenhausaufenthalte verkürzen und Therapiemöglichkeiten verbessern. Außerdem kann durch das Ermitteln von Erkrankungen und deren Stadium das Fortschreiten von Krankheiten verlangsamt werden. In der lebenswissenschaft-

## 1. Einleitung

lichen Forschung werden Immunoassays für die Untersuchung von biologischen Systemen eingesetzt, um verschiedene Proteine, Hormone und Antikörper aufzuspüren. In der Industrie nutzt man Immunoassays, um Schadstoffe in Lebensmitteln und Wasser zu erkennen und in der Qualitätskontrolle zur Überwachung von Molekülen, die während der Produktentwicklung genutzt werden.

Das Prinzip der Immunoassays beruht auf der Erkennung eines Analyten in flüssiger Phase anhand der Bindung eines Antikörpers an spezifische Molekülstrukturen. Dabei macht man sich die hohe Bindungsstärke und Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung zu nutze. Beim Eintritt von körperfremden Molekülen (Antigene) werden Antikörper vom Organismus produziert. Antigen und Antikörper gehen eine Bindung ein, wann immer sie aufeinander treffen.

Grundsätzlich steht man bei der Entwicklung eines neuen diagnostischen Assayformats einigen Herausforderungen gegenüber. Der Entwicklungsprozess, angefangen beim wissenschaftlichen Forschungserfolg bis hin zum praktischen Einsatz einer neuen sensitiven, selektiven und verlässlichen Technologie am Patienten, dauert lange, ist kostspielig und aufwendig in der Umsetzung. Mit der Ausstattung eines üblichen Forschungslabors ist dies kaum zu bewältigen. Industrielle Unternehmen können an dieser Stelle das nötige Kapital und das Wissen mitbringen, um den Weg vom vielversprechenden Forschungsergebnis bis hin zum Einsatz in Krankenhäusern und Arztpraxen zu ebnen. Zusätzlich zum finanziellen Aufwand kommen der Zeitfaktor, die Infrastruktur, Richtlinien der Aufsichtsbehörden und nötige Erfahrungen hinzu, um eine Diagnose auf dem neuesten technologischen Wissensstand ermitteln zu können. Die hohen Kosten bei der Einführung einer neuen Technologie auf dem Markt im Vergleich zum unmittelbaren Nutzen für Ärzte und Patienten stellen ein großes Problem dar. Der Aufwand, ein diagnostisches Labor auf eine neue Technologie umzurüsten bzw. zu ergänzen, ist immens. Alle Einflussfaktoren bei der Entwicklung eines diagnostischen Testverfahrens müssen berücksichtigt werden. Für das wissenschaftliche Verständnis von Krankheiten und deren Bekämpfung anhand der Entwicklung und Umsetzung geeigneter Detektionsverfahren ist eine vielschichtige Betrachtungsweise erforderlich.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil wird eine schnelle und effiziente Methode für die Konstruktion eines miniaturisierten Frei-Fluss-Elektrophorese ( $\mu$ FFE)-Chips vorgestellt. Bestehend aus zwei Polymethylmethacrylat (PMMA)-Platten, die über zwei Transferklebebänder als strukturgebendes Material miteinander verbunden sind, bietet diese Technik eine Alternative zu verschiedenen bis jetzt in der Literatur beschriebenen  $\mu$ FFE-Chips. Dort kommen z.B. Borsilikatglas mit schmalen Seitenkanälen und Borofloatglas zum Einsatz oder Polydimethylsiloxan (PDMS) und Laserdruck-Toner als strukturgebendes Material auf Glassubstraten [4, 5, 6]. In der wissenschaftlichen Forschung ist PDMS das am häufigsten verwendete Material bei der Chipherstellung. Wenn es jedoch zur Kommerzialisierung kommt, stößt PDMS bezüglich Bearbeitbarkeit und Skalierungsfak-



toren an seine Grenzen [7, 8]. PMMA wiederum ist ein Polymer mit vielen Vorteilen, wie z. B. gute mechanische Bearbeitbarkeit, optische Transparenz und hohe Spannungsfestigkeit [9]. Außerdem eignet sich PMMA besser für eine kostengünstige Massenproduktion als Glas oder Quarzglas.

Es wird ein  $\mu$ FFE-Chip konzipiert und mit möglichst geringem Zeitaufwand und einfachen Mitteln konstruiert. Dabei kann der Separationsprozesses im Trennkanal mittels einer optischen Detektionsmethode beobachtet werden. Das Design sieht es nicht vor, die einzelnen Fraktionen aufzufangen, wie es in anderen Entwürfen angewendet wurde [10, 11].

Im zweiten Teil der Arbeit wird die Funktionsfähigkeit des  $\mu$ FFE-Chips an unterschiedlichen biologischen Systemen untersucht. Zum Einen soll die isoelektrische Fokussierung (IEF) zweier Proteine und eines Oligonukleotids gezeigt werden; zum Anderen die IEF des Systems Strep-Tactin® und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP).

Anhand der Kombination von miniaturisierter Frei-Fluss-Elektrophorese und der Methode des Immunoassays wird am System von Immunglobulin G und Anti-Immunglobulin G demonstriert, wie vielseitig diese Technik eingesetzt werden kann, um bestimmte Verfahrensabläufe zu vereinfachen und Alternativen aufzuzeigen.



## 2. Grundlagen

### 2.1. Elektrophoretische Analytik in der chip-basierten Mikrofluidik

Bei vielen Anwendungen, insbesondere in der medizinischen Diagnostik, sind nur kleine Probenmengen verfügbar. Diese Tatsache macht eine Miniaturisierung und demzufolge den Einsatz von „Lab-on-a-chip“ (LOC)-Technologien erforderlich mit der Folge, dass im bestmöglichen Fall ein komplettes Labor auf Chipgröße reduziert wird.

Die ersten  $\mu$ FFE-Einheiten wurden Mitte der 1990er Jahre im Zuge der Entwicklung von chipbasierten Mikrofluidik-Systemen realisiert. Seit der ersten Veröffentlichung eines FFE-Mikrochips im Jahre 1994 durch Raymond et al. hat das Interesse an der Miniaturisierung von FFE-Systemen stetig zugenommen [12]. Diese ermöglichen eine mikropräparative Trennung von kontinuierlich fließenden Analytströmen im Mikrofluidik-Chip. Verglichen mit den vormals etablierten makroskopischen FFE-Systemen, die 1960 von K. Hannig entwickelt und optimiert wurden, bestanden die größten Vorteile der mikrofluidischen Systeme in der signifikanten Reduzierung des Proben- und Puffervolumens, einer besseren Wärmeabfuhr durch ein etwa hundertfach höheres Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis, der erheblich verkürzten Analysezeit und einem verbesserten Separationsergebnis [13, 14].

Betrugen die Flussraten in Makro-FFE-Systemen noch einige  $\text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$  und die Verweildauern der Analyten im Separationskanal 20 min, bewegt man sich in Mikrochip-Systemen bezüglich der Flussraten in Bereichen von wenigen  $\text{mm} \cdot \text{sec}^{-1}$  bei Verweildauern von wenigen Sekunden. Laut der Skalierungsgesetze geht eine zehnfache lineare Verkleinerung des Systems mit einer hundertfach schnelleren Trennung einher [15]. Benötigte man in den Anfangszeiten noch ein Puffervolumen von 2,5 l für eine Protein-Auftrennung von 100 ml Serum, so belaufen sich die Volumina heute auf einige  $\mu\text{l}$  oder sogar nl. Eine lineare Reduzierung der Systemgröße um den Faktor  $10^3$  führt zu einer Volumenreduzierung um den Faktor  $10^9$  [16]. Der erste von Raymond vorgestellte Mikrochip, mit dem die Auftrennung von fluoreszenzmarkierten Aminosäuren demonstriert wurde, war im Vergleich zum System von Hannig mit einem Trennkanalvolumen von 2,5 ml etwa hundertmal kleiner und benötigte zur Auftrennung nur Spannungen im Bereich von 50 V anstatt 1500 V [17, 12]. Auch die steigende Anzahl der Publikationen zeigt das große Interesse auf diesem Feld. Die Miniaturisierung der  $\mu$ FFE-Systeme ist weiter vorangeschritten und der Anwendungsbereich hat sich vergrößert. Neben Farbstoffen [18, 19, 5, 20]

## 2. Grundlagen

und Aminosäuren [12, 5] werden vor allem Hormone [21], DNA [22, 23, 24], Peptide und Proteine [25, 26, 27, 28, 29] aufgetrennt.

Die Aufreinigung und Separation von DNA und vor allem von Proteinen ist von großer Wichtigkeit in Bereichen der Medizin und pharmazeutischen Diagnostik. In den Nukleinsäuren der DNA sind zwar die Informationen codiert, die in Millionen Proteinmoleküle übersetzt werden; diese befinden sich jedoch nicht alle gleichzeitig in einer Zelle.

Es gibt keinen genetischen Unterschied zwischen Raupe und Schmetterling, zu dem die Raupe sich entpuppt. Was sie voneinander unterscheidet, ist das Expressionsmuster der Proteine, die von den Genen synthetisiert werden [30]. Wie bei Raupe und Schmetterling verändert sich auch das menschliche Protein-Expressionsmuster beim Aufkommen einer Krankheit, weshalb die Erforschung der Proteomik gerade im Bereich der Frühdiagnostik eine sehr wichtige Rolle spielt.

Eine Reihe komplexer Proteingemische kann mit Hilfe der FFIEF analysiert und identifiziert werden. Einer der großen Vorteile dieser Technik ist ihre Funktionalität. Verschiedene Zelllinien wurden mittels der FFIEF in Verbindung mit der RPLC (Reverse Phase Liquid Chromatography)-Peptidseparation für das Protein-Mapping ermittelt [31]. Darüber hinaus wurden Untersuchungen auf der Grundlage einer iterativen FFE durchgeführt, um die Komplexität des Plasma-Proteoms zu reduzieren [32]. Das zeigt die erfolgreiche Adaptierung der FFE an Proteomik-Experimente und deren immer größer werdenden Stellenwert auf diesem Gebiet.

Oligonukleotide mit einer Länge von 20-30 Basen gewinnen immer mehr an Bedeutung bezüglich genetischer Analysen in der Agrarwirtschaft, Forensik, Pathogenitäts-Detektion und Pharmakogenomik [33]. Es wurde gezeigt, dass Nukleinsäuren eine steigende klinische Relevanz für die Früherkennung von Krebs und nicht-invasive prenatale Diagnostik haben [34, 35]. Dabei sind unterschiedliche Methoden zur Konzentration und Separation von DNA entwickelt worden. „end-labelled free solution electrophoresis“ oder „free solution capillary electrophoresis“ sind nützliche Methoden zur Erkennung und Trennung für einen großen Bereich von DNA-Fragmenten [36, 37, 32]. Im Bereich der Molekularbiologie ist die Auftrennung von DNA oder RNA eine Grundvoraussetzung für die Analyse und Isolation. Für viele Methoden in diesem Bereich ist es von großer Wichtigkeit, zu Beginn der Untersuchung separierte und aufgereinigte Nukleinsäuren vorliegen zu haben.

Eine der großen Herausforderungen bei der Herstellung von  $\mu$ FFE-Chips ist es, Gasblasen und Verunreinigungen am Eintreten in den Trennraum zu hindern. Speziell Wasserstoff- und Sauerstoffblasen, die während der Elektrolyse an den Elektroden entstehen, müssen aus dem Mikrokanal entfernt werden, da sie sonst die Strömung beeinträchtigen und im schlimmsten Fall ganze Kanäle blockieren können. Eine Störung der Strömung bedeutet in jedem Fall auch eine Störung der elektrischen Verbindung [4].

Kohlheyer et al. untersuchte die Implementierung von Elektroden in  $\mu$ FFE-Systeme [1]. Grundsätzlich werden vier verschiedene Implementierungsansätze gezeigt: 1) Offene Elektrodenbetten mit einer membran-ähnlichen Struktur oder Strukturen mit gleicher Funktion, 2) geschlossene Elektrodenbetten mit membran-ähnlichen Struk-

## 2.1. Elektrophoretische Analytik in der chip-basierten Mikrofluidik

turen, 3) Elektroden direkt in der Trennkammer und 4) eine mechanisch und elektrisch isolierte Trennkammer. Die verschiedenen Modelle wurden hinsichtlich Spannungseffizienz, Beseitigung von Gasblasen und Nebenprodukten, Stabilität des elektrischen Feldes und Trenneffizienz untersucht.

Alle Ansätze haben ihre Vor- und Nachteile. Vergleiche müssen jedoch mit Bedacht gezogen werden, da viele Aspekte berücksichtigt werden müssen, die nur schwer zu vergleichen sind [1]. Beispielsweise wurden photo-polymerisierte, ionenpermeable Salzbrücken als Membranenstruktur und Barriere für Gasblasen genutzt [4]. Die Stabilität dieser Membranen ist allerdings oft nur unzureichend. Ein anderer Ansatz basiert auf der Mikrostrukturierung von Seitenkanälen als Verbindung von Elektroden und Trennraum. Diese Anordnung kann jedoch zu einem Spannungsabfall von bis zu 90 % führen [5].

Aufgrund des sehr viel kleineren Volumens in miniaturisierten Systemen und der damit verbundenen geringen Anzahl an Analytmolekülen sind sehr sensitive Detektionsmethoden erforderlich. Die am häufigsten genutzte Detektionsmethode in  $\mu$ FFE-Systemen ist die Fluoreszenz [18, 38, 39, 40]. Über Fluoreszenzlabels, mit denen die Analyte markiert werden, kann bei Anregung mit einer auf das jeweilige Label abgestimmten Wellenlänge das Emissionsspektrum detektiert werden. Realisiert wurden aber auch schon Systeme, die mit Massenspektroskopie [5], Surface Plasmon Resonance (SPR) [1], Surface Enhanced Raman Spectroskopie (SERS) [41] und labelfreier nativer Fluoreszenz gekoppelt wurden [42].

Dass sich funktionsfähige Makrosysteme nach und nach mit größerer Effizienz auf miniaturisierte Gesamtanalysensysteme ( $\mu$ TAS) verkleinern lassen und für viele Anwendungen sehr attraktiv machen, zeigt den Trend zur LOC-Technologie. Diese ermöglicht es, aufgrund der geringen Abmessungen der Mikrosysteme, mehrere Analyseschritte, wie Probenvorbereitung, Reaktion, Separation und Monitoring auf einem Chip durchzuführen. Die Mikrosysteme im „Hosentaschenformat“, die auch schon kommerziell vertrieben werden, sind einfach zu handhaben, flexibel und ermöglichen „point-of-care-testing“ direkt am Patienten. Sie werden aber nicht nur für medizinische Zwecke eingesetzt, sondern auch für das pharmazeutische Wirkstoffscreening mit hohem Durchsatz, deren Anforderungen an Genauigkeit von Makrosystemen nicht erfüllt werden können. Auch findet die LOC-Technologie Anwendung bei der Bekämpfung von Terrorismus im Auffinden von möglichen Giftstoffen in Luft, Lebensmitteln und Wasser. Die Forschung setzt dabei auf den Einsatz von Kunststoffen und Polymeren, um Kosten für Silizium und Glas einzusparen und schnellere Produktionsabläufe zu schaffen. Um allerdings LOC-Systeme für den kommerziellen Markt lukrativ zu machen, müssen sie genügend Vorteile bieten, um die Entwicklungskosten entsprechender Anlagen zu rechtfertigen oder sich leicht in schon bestehend High-Throughput-Screening (HTS)-Systeme integrieren lassen [43].

## 2. Grundlagen

### 2.2. Elektrohydrodynamik

In vielen mikrofluidischen Kanälen und LOC-Anwendungen werden Flüssigkeitsströme elektrisch reguliert. Zur Beschreibung der elektrischen Eigenschaften von Flüssigkeiten wird die Elektrohydrodynamik herangezogen. Die für die Betrachtung der Elektrophorese benötigten Zusammenhänge in diesem Kapitel werden auf der Grundlage von „Theoretical Microfluidics“ von H. Bruus [16] hergeleitet.

Bei Strömungen newtonscher Flüssigkeiten, auf die ein elektrisches Feld wirkt, benutzt man die Navier-Stokes-Gleichung erweitert um die Wirkung des elektrischen Feldes, die elektrische Volumenkraft  $\rho_{el}\mathbf{E}$ , auf das Geschwindigkeitsvektorfeld:

$$\rho \left( \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \nabla \mathbf{v} \right) = -\nabla p + \eta \nabla^2 \mathbf{v} + \rho \mathbf{g} + \rho_{el} \mathbf{E}. \quad (2.1)$$

Die Linke Seite der Gleichung beschreibt die Änderung des Geschwindigkeitsvektorfeldes unter Einwirkung der auf der rechten Seite aufgeführten Kräfte, die aufgrund der Änderung des Druckes  $p$ , der dynamischen Viskosität  $\eta$ , der Gravitation  $\mathbf{g}$  und der Ladungsdichte  $\rho_{el}$  einer Flüssigkeit im externen elektrischen Feld entstehen.

Für ein Kontinuum-Modell können bei der Betrachtung des elektrischen Feldes die Maxwell-Gleichungen angewendet werden. Falls magnetische Eigenschaften für die nachfolgenden Untersuchungen aufgrund verschwindend kleiner Effekte vernachlässigt werden können, ergeben sich folgende Maxwell-Gleichungen:

$$\nabla \times \mathbf{E} = 0, \quad (2.2)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{E} = \frac{\rho_{el}}{\epsilon}. \quad (2.3)$$

Die dazugehörige elektrische Stromdichte  $\mathbf{J}_{el}$  ist gegeben durch:

$$\mathbf{J}_{el} = \sigma_{el} \mathbf{E}. \quad (2.4)$$

Dabei stellt  $\sigma_{el}$  die elektrische Leitfähigkeit dar.

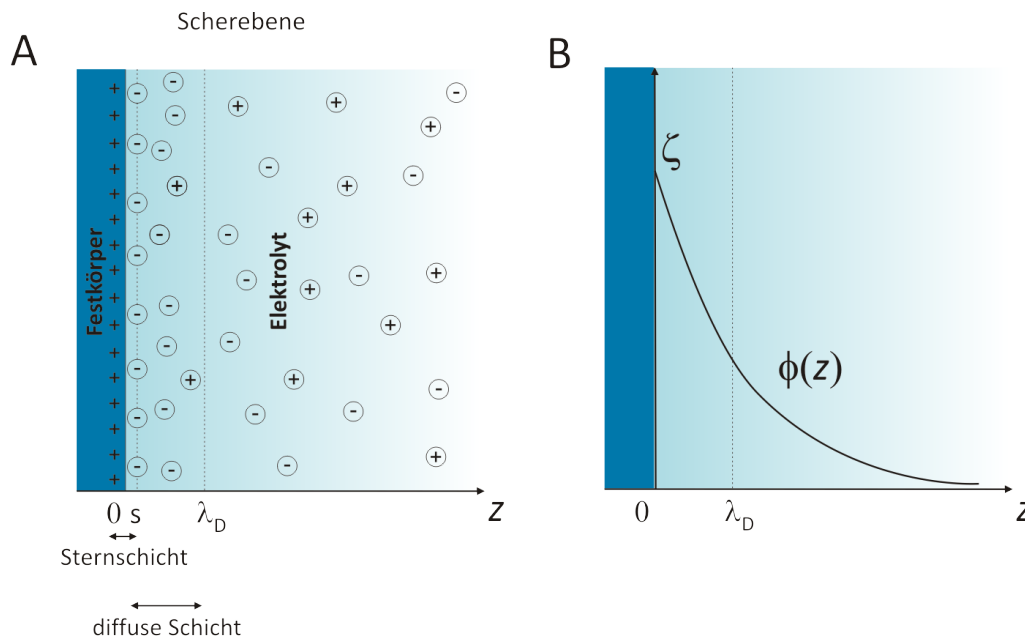
Entsprechend Gleichung (2.2) kann das elektrische Feld als negativer Gradient des Potentials  $\phi$  ausgedrückt werden. Wird  $\epsilon$  konstant gehalten, kommt man beim Einfügen in Gleichung (2.3) auf die Poisson-Gleichung

$$\begin{aligned} \mathbf{E} &= -\nabla \phi, \\ \nabla \cdot (-\nabla \phi) &= \frac{\rho_{el}}{\epsilon}, \\ \nabla^2 \phi(\mathbf{r}) &= -\frac{1}{\epsilon} \rho_{el}(\mathbf{r}). \end{aligned} \quad (2.5)$$

Die oben genannten Gleichungen werden zur Beschreibung von elektrohydrodynamischen Effekten in der Mikrofluidik verwendet.

### 2.2.1. Modell der Doppelschicht an Grenzflächen

Einige Materialien entwickeln eine Oberflächenladung, wenn sie in Kontakt mit einem Elektrolyten (z.B. wässriges Medium) kommen, wie z.B. Mikrofluidik-Kanäle, in denen Elektrolyt fließt oder auch Partikel in Lösungen. Je nach chemischer Zusammensetzung des Feststoffes und des Elektrolyten tritt in Folge eines Grenzflächenphänomens ein Ladungstransport zwischen Elektrolyt und Kanalwand auf. Diese werden entgegengesetzt geladen, während sie insgesamt nach außen elektrisch neutral bleiben. Bei häufig verwendeten Materialien für mikrofluidische Kanäle, wie Glas, geben Silanolgruppen  $H^+$ -Ionen ab, wodurch die Kanaloberfläche negativ geladen wird. Diese Oberflächenladung beeinflusst die Ionenverteilung im Elektrolyten nahe der Oberfläche durch die Anziehung entgegengesetzt geladener Ionen und die Abstoßung von Ionen gleichnamiger Ladung. Eine derartige Ansammlung von Ionen an der geladenen Oberfläche führt zur Bildung der sogenannten elektrischen Doppelschicht. Ionen, die sich direkt an der Oberfläche des Kanals befinden, werden so stark beeinflusst, dass sie teilweise unbeweglich sind. Sie bilden die sogenannte



**Abbildung 2.1.:** A) Ionenstruktur im Elektrolyten nahe einer Festkörper-Oberfläche. Im Bereich  $0 < z < s$  befindet sich die Schicht der unbeweglichen Gegenionen, die Sternschicht. Für  $s < z < \lambda_D$  schließt sich eine diffuse bewegliche Schicht von vornehmlich Gegenionen an. Für  $z > \lambda_D$  ist der Elektrolyte elektrisch neutral. B) Elektrisches Potential  $\phi(z)$  in der Debye-Doppelschicht. Das Potential der Sternschicht nahe der Festkörper-Oberfläche hat das Potential  $\phi(0) = \zeta$ , während es mit zunehmendem  $z$  gegen Null konvergiert (erstellt nach [16]).

Sternschicht, deren Dicke etwa einem Ionendurchmesser entspricht. Die sich anschlie-

## 2. Grundlagen

ßende diffuse Doppelschicht enthält bewegliche hydratisierte Ionen, deren Verteilung vom Einfluss der elektrischen Kräfte und der zufälligen Wärmebewegung abhängt. Die Ausdehnung dieser Schicht wird als Debye-Länge  $\lambda_D$  bezeichnet. Die Scherebene trennt die Sternschicht von der diffusen Doppelschicht. Das elektrische Potential an dieser Ebene wird Zeta-Potential  $\zeta$  genannt (siehe Abb. 2.1).

### 2.2.2. Elektrokinetische Effekte

Nachdem die elementaren Gleichungen der Elektrohydrodynamik erarbeitet wurden, folgen nun vier in der Mikrofluidik relevante elektrokinetische Effekte, die alle die Bewegung von Flüssigkeiten relativ zu den geladenen Oberflächen betreffen.

Die für diese Arbeit besonders relevanten Effekte der Elektrophorese und Elektroosmose werden im Kapitel „Theorie der Elektrophorese“ auf S. 12 wieder aufgegriffen.

- **Elektrophorese** - die Bewegung geladener Teilchen in einem Trägermaterial, hervorgerufen durch ein angelegtes elektrisches Feld.
- **Elektroosmose** - eine durch die Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht induzierte Bewegung entlang einer Phasengrenze, hervorgerufen durch ein angelegtes elektrisches Feld als Folge eines Grenzflächenphänomens zwischen Elektrolytlösung und z.B. Kapillarwand, Mikrokanalwand oder einer anderen fluidischen Leitung.
- **Sedimentationspotential** - das elektrische Potential entsteht durch Bewegung geladener Teilchen, veranlasst durch Gravitation oder Zentrifugation in Lösungen, deren elektrische Doppelschicht gestört wird. Dadurch ergibt sich eine Verschiebung zwischen Oberflächenladungen und elektrischer Ladung der diffusen Schicht, woraus das Sedimentationspotential resultiert.
- **Strömungspotential** - das elektrische Potential entsteht, wenn ein Elektrolyt aufgrund eines Druckgradienten durch einen Kanal mit geladenen Wänden geleitet wird

## 2.3. Grundlagen und Theorie der Elektrophorese

### 2.3.1. Das Prinzip der Elektrophorese

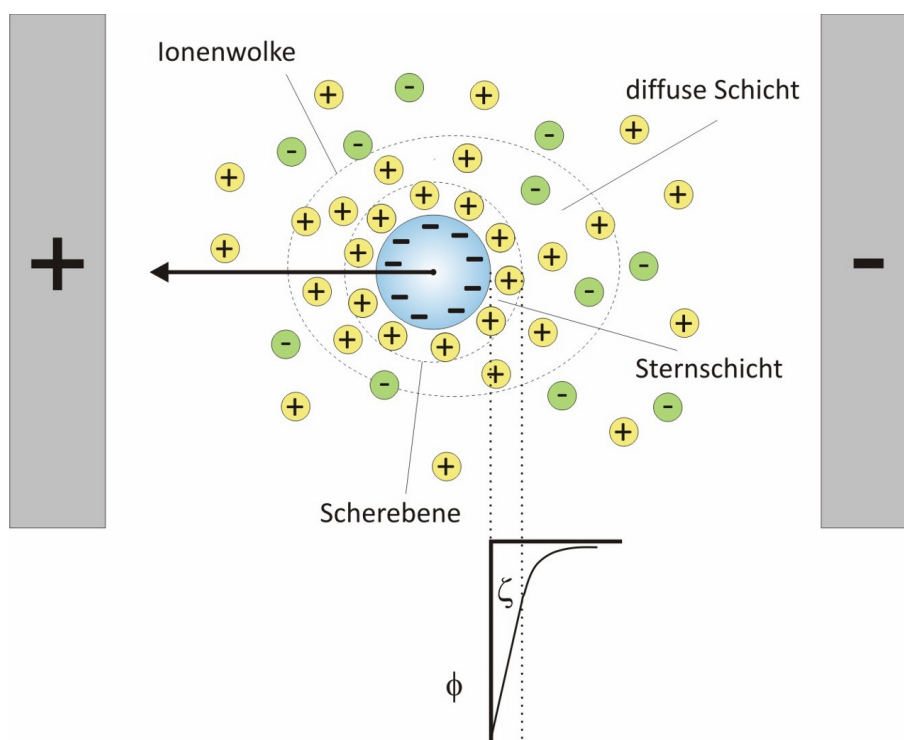
Als Elektrophorese bezeichnet man die Bewegung von geladenen, gelösten Teilchen und Molekülen mit elektrischer Doppelschicht relativ zu einer stationären Flüssigkeit bei angelegtem gleichförmigen elektrischen Feld (siehe Abb. 2.2). Erstmals wurden die Eigenschaften der Polyionen mit dem Helmholtz-Modell beschreiben. Dies geht davon aus, dass sich die Gegenionen in einem bestimmten Abstand zur geladenen Oberfläche des Teilchens befinden, weshalb die Doppelschicht als Kugelkondensator angesehen werden kann. Dessen elektrisches Potential fällt linear mit Entfernung von



### 2.3. Grundlagen und Theorie der Elektrophorese

der geladenen Oberfläche ab. Das Helmholtz-Modell wurde vom Gouy-Chapman-Modell dahingehend korrigiert, dass es sich nicht um eine fixierte Anordnung von Gegenionen um das geladene Teilchen handelt, sondern sich die Gegenionen durch gegenseitige Abstoßung und Diffusion in Bewegung befinden. Das elektrische Potential der Doppelschicht fällt demnach exponentiell mit dem Abstand von der geladenen Oberfläche des Teilchens. Die Kombination dieser beiden Modelle folgte dann durch das Modell von Stern [44]:

Im elektrischen Feld bewegt sich der fixierte Teil der Ionenatmosphäre mit dem geladenen Partikel, die Gegenionen des diffusen Teils bewegen sich zum entgegengesetzten Pol. Bis zur Grenze zwischen fixiertem und diffussem Teil der Ionenatmosphäre sinkt das Potential des geladenen Partikels zunächst linear, bevor es dann einen exponentiellen Verlauf annimmt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladungen und



**Abbildung 2.2.:** Modell von Stern: Elektrische Doppelschicht um ein negativ geladenes Teilchen. Die Ionenatmosphäre besteht aus einem fixierten Teil, der aus hydratisierten Gegenionen aufgebaut ist, die auf der hydratisierten geladenen Oberfläche adsorbiert sind, und einem diffusen Teil, der aus den übrigen Gegenionen besteht, die ebenso hydratisiert sind. Sobald ein elektrisches Feld angelegt wird, wandert das Teilchen in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode.

Massen wandern die verschiedenen Komponenten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und werden so in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Die elektrophoretische Mobilität, die ein Maß für die Wandergeschwindigkeit ist, stellt eine charakteristische

## 2. Grundlagen

Größe eines geladenen Partikels oder Moleküls dar und ist abhängig vom  $pK_s$ -Wert und der Größe des Moleküls oder Partikels. Beeinflusst wird die elektrophoretische Mobilität von Art, Konzentration und pH-Wert der Pufferlösung, der Temperatur, der elektrischen Feldstärke und dem Trägermaterial [45]. Die Elektrophorese ist die am häufigsten verwendete Methode, um Proteingemische aufzutrennen und die hohe Probenkomplexität im Feld der *Proteomik* zu reduzieren [39]. Seit der Erfindung der „moving boundary method“ für die elektrophoretische Trennung durch Tiselius im Jahre 1937 [46] hat sich die Elektrophorese stetig weiterentwickelt. Untersuchungsobjekte sind Polyionen, wie Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, Viren, Zellfragmente und ganze Zellen, wodurch sie Anwendung findet in Bereichen der biologischen und biochemischen Forschung, Pharmakologie, forensischen Medizin, klinische Diagnostik und Lebensmittelkontrollen [45].

Die wichtigste Eigenschaft einer elektrophoretischen Methode ist ihre *Auflösung*. Diese hängt vom *Trennvermögen* und der *Trennschärfe* der Elektrophorese ab. Das Trennvermögen bezeichnet die Fähigkeit der Elektrophorese, zwei Probenkomponenten voneinander zu trennen. Die Trennschärfe berechnet sich mit dem reziproken Wert der Bandenbreite. Sind die Banden schmal, bedeutet dies eine hohe Trennschärfe; sind die Banden breit, ist die Trennschärfe geringer.

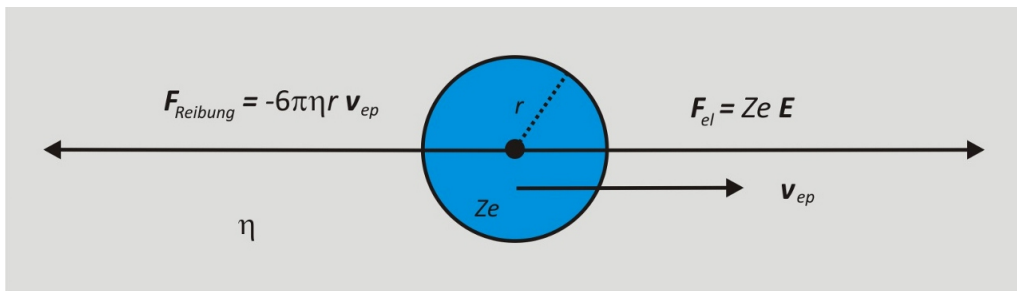
Beeinflusst werden Trennschärfe und Trennvermögen durch die Eigenschaften der zu trennenden Substanzen, des Trennmediums und der äußeren Bedingungen, wie etwa der Temperatur. Bei erhöhter Temperatur verstärkt sich die Diffusion, was wiederum negativen Einfluss auf die Auflösung der Elektrophorese hat. Deshalb ist es wichtig, elektrophoretische Trennungen bei relativ niedrigen Temperaturen durchzuführen-auch um die verwendeten biologischen Proben möglichst wenig zu schädigen.

### 2.3.2. Theorie der Elektrophorese

Elektrophoretische Trennungen können in festen oder in flüssigen Trennmedien durchgeführt werden. Bei der *Träger-Elektrophorese* werden als feste Medien meistens Gele verwendet, die in ihren Poren Pufferlösung enthalten. Störeffekte, wie Diffusion und Konvektion im Puffer spielen bei der *trägerfreien Elektrophorese* nur eine sehr untergeordnete Rolle. Ein Beispiel für die Träger-Elektrophorese ist die *Gel-Elektrophorese*. Häufig angewendet wird die Gel-Elektrophorese mit Agarose- und Polyacrylamidgel, wobei das Polyacrylamidgel das gebräuchlichste Trennmedium ist. Es enthält im Gegensatz zu anderen Gelen keine geladenen Gruppen, die elektroosmotische Effekte begünstigen. Die Gel-Elektrophorese kann in nichtrestriktiven Gelen (Agarose- oder Polyacrylamidgele mit niedriger Konzentration) und in restriktiven Gelen (Polyacrylamidgele mit hoher Konzentration) erfolgen. In nichtrestriktiven Gelen werden die zu untersuchenden Substanzen abhängig von ihren elektrischen Ladungen getrennt, in restriktiven Gelen erfolgt die Trennung zusätzlich zur elektrischen Ladung nach der Masse. Wenn die Porengröße restriktiver Gele mit der Größenordnung der Polyionen vergleichbar ist, agiert das Gel wie eine Art Sieb, was die Auflösung der Elektrophorese erhöht.

## 2.3. Grundlagen und Theorie der Elektrophorese

Flüssige Trennmedien werden durch Pufferlösungen realisiert, die durch Zugabe entsprechender Substanzen, wie z.B. Glycerin oder Cellulose-Gemische, höhere Viskosität erlangen. Elektrophoretische Trennungen dieser Kategorie werden als trägerfreie Elektrophorese bezeichnet. Diese wird meist zur Trennung von größeren Teilchen eingesetzt und zum Teil stark durch Diffusion und Konvektion beeinflusst, welche sich negativ auf die elektrophoretische Auflösung auswirken. Ein wichtiges Beispiel der trägerfreien Elektrophorese ist die *Frei-Fluss-Elektrophorese*, bei der ein Puffer senkrecht zu einem elektrischen Feld fließt und die getrennten Fraktionen am Ende separat gesammelt werden können. Sie wird zur Trennung von Polyionen, Zellorganellen und ganzen Zellen eingesetzt. Häufig angewendete Betriebsarten sind die *Frei-Fluss-Zonenelektrophorese*, die *Frei-Fluss-Isoelektrische Fokussierung* und die *Frei-Fluss-Isotachophorese*.



**Abbildung 2.3.:** Das Prinzip der Elektrophorese. Ein sphärischer Partikel mit der Ladung  $Ze$  und dem Radius  $r$  bewegt sich in einer niedrigleitenden Flüssigkeit mit einer Viskosität  $\eta$  unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes  $\mathbf{E}$ . Die Bewegung bleibt gleichförmig bei einer Geschwindigkeit  $\mathbf{v}_{ep}$ , wenn die Stokes'sche Reibungskraft  $\mathbf{F}_{Reibung}$  und die treibende Kraft des elektrischen Feldes  $\mathbf{F}_{el}$  sich ausgleichen (nach [16]).

Wie in [16] beschrieben, betrachtet man im einfachsten Fall der Elektrophorese den Einfluss eines elektrischen Feldes  $E$  auf einen sphärischen Partikel mit dem Radius  $r$  und der Ladung  $Ze$  in einer niedrig leitenden stationären Flüssigkeit (z.B. deionisiertem Wasser). Hierdurch soll die Akkumulation von Ionen um den geladenen Partikel und die dadurch evtl. auftretende teilweise Neutralisierung seiner Ladung verhindert werden. Für diesen vereinfachten Fall erhält man für die elektrophoretische Kraft, wie in Abb. 2.3 dargestellt, die Beziehung

$$\mathbf{F}_{el} = Ze\mathbf{E}, \quad (2.6)$$

wobei  $e$  die Elementarladung und  $Z$  die Ordnungszahl  $Z$  bezeichnet. Weiterhin nimmt man an, dass die beschleunigende Kraft bei der Elektrophorese der Reibungskraft entspricht und deshalb eine konstante *elektrophoretische Geschwindigkeit*  $\mathbf{v}_{ep}$  (in m/s) vorherrscht. In diesem Fall gleichen sich die Stokes'sche Reibungskraft  $\mathbf{F}_{Reibung} = -6\pi\eta r \mathbf{v}_{ep}$  und elektrophoretische Kraft  $\mathbf{F}_{el}$  aus:

$$\mathbf{F}_{tot} = \mathbf{F}_{el} + \mathbf{F}_{Reibung} = 0 \quad \Rightarrow \quad \mathbf{v}_{ep} = \frac{Ze}{6\pi\eta r} \mathbf{E} \equiv \mu_{ep} \mathbf{E}, \quad (2.7)$$

## 2. Grundlagen

wobei  $\eta$  die dynamische Viskosität des Lösungsmittels und  $r$  der Radius des geladenen Teilchens ist. Die Abhängigkeit der resultierenden elektrophoretischen Geschwindigkeit  $\mathbf{v}_{ep}$  von Ladung und Größe des Partikels macht die Elektrophorese in Bereichen der Biochemie zum Auftrennen von Proteinen und DNA-Fragmenten nutzbar [16]. Die Proportionalitätskonstante  $\mu_{ep}$  wird als *elektrophoretische Mobilität* bezeichnet,

$$\mu_{ep} \equiv \frac{Ze}{6\pi\eta r}. \quad (2.8)$$

Diese einfache theoretische Abschätzung basiert auf einem makroskopischen Kontinuum-Modell und zeigt gute Übereinstimmung mit Messwerten der Beweglichkeit von Ionen mit einem Radius im unteren nm-Bereich in Wasser. Der Radius  $r$  ist nicht der bloße Ionenradius  $r \approx 0,05$  nm, sondern der größere sogenannte hydratisierte Ionenradius  $r \approx 0,2$  nm, da Ionen in wässriger Lösung von einer Atomlage Wassermoleküle umgeben sind. Hierbei wird angenommen, dass sich das Teilchen in einer unendlich verdünnten Lösung befindet.

Für ein Ion mit der Ordnungszahl  $Z = 1$  und dem Ionenradius  $r = 0,2$  nm in einem Medium mit der Viskosität  $\eta = 1$  mPa · s ergibt sich:

$$\mu_{ep} \approx 4 \times 10^{-8} \text{m}^2(\text{Vs})^{-1}. \quad (2.9)$$

Mit den Gleichungen 2.4 und 2.8, ergibt sich der Zusammenhang von Ionenmobilität  $\mu_{ep}$  und Ionenleitfähigkeit  $\sigma_{el}$ ,

$$\mu_{ep}\mathbf{E} = \mathbf{v}_{ep} = \frac{1}{Zec_{Ion}}\mathbf{J}_{el} = \frac{\sigma_{el}}{Zec_{Ion}}\mathbf{E} \quad (2.10)$$

$$\Rightarrow \sigma_{el} = Zec_{Ion}\mu_{ep} \approx \frac{Zc_{Ion}}{1 \text{ mM}} \times 10^{-2} \text{S} \cdot \text{m}^{-1}, \quad (2.11)$$

wobei die Ionenkonzentration in diesem Beispiel auf  $c_{Ion} = 1$  mM normiert wurde. Die so gewonnenen Resultate stimmen mit den experimentell bestimmten Werten für  $\sigma_{ep}$  überein.

In realen Systemen jedoch bewegt sich das geladene Teilchen mit dem auf seiner Oberfläche gebundenen Teil der Ionenatmosphäre. Auf dem Teilchen wird deshalb nicht das absolute Potential  $\phi$ , sondern das elektrokinetische Potential  $\zeta$  (Potential an der Grenze zwischen dem Teilchen mit den adsorbierten Gegenionen und dem diffusen Teil der Ionenatmosphäre) gemessen. Damit gilt für die dann verminderte elektrophoretische Mobilität des Ions:

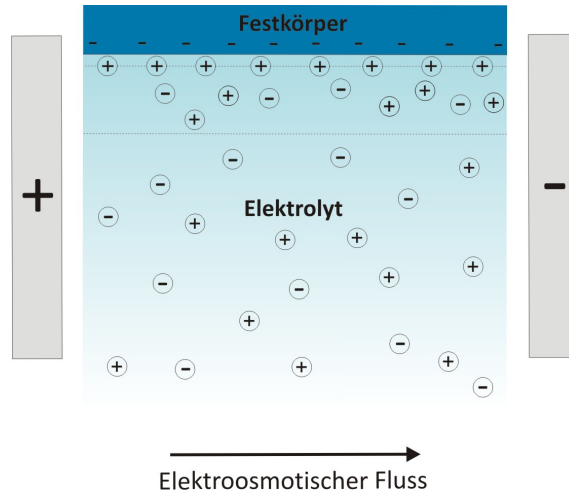
$$\mu_{ep} = \frac{v}{E} \quad (2.12)$$

Für Teilchen, bei denen die Debye-Länge (Breite der diffusen Schicht) klein gegenüber der Teilchengröße ist, wird  $\mu_{ep}$  üblicherweise über die Smoluchowski-Gleichung ausgedrückt:

$$\mu_{ep} = \frac{\epsilon_0\epsilon_r\zeta_T}{\eta} \quad (2.13)$$

mit dem Potential des Teilchens  $\zeta_T$ , der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_0$  und der Permeabilität  $\epsilon_r$  des Lösungsmittels.

## Elektroosmotischer Fluss



**Abbildung 2.4.:** Elektrische Doppelschicht an einer negativ geladenen Kanalwand und elektroosmotischer Fluss.

Wird ein elektrisches Feld parallel zur einer geladenen Oberfläche (z.B. Glas, Teflon, Polymere) mit elektrischer Doppelschicht angelegt, weisen die beweglichen Ionen im Bereich der diffusen Schicht eine Bewegung auf, die entgegengesetzt gerichtet ist zur Bewegungsrichtung, die vom angelegten elektrischen Feld bedingt ist, und ziehen die Lösung mit sich. Der entstehende Fluss wird als elektroosmotischer Fluss (EOF) bezeichnet [47]. Die Elektroosmose wirkt sich negativ auf die Elektrophorese aus, da die verwendete Elektrolytlösung (Pufferlösung) gegen die Richtung der wandernden Polyionen fließt. Um Anionen auftrennen zu können, muss eine Bewegung in Richtung Anode erfolgen. Dies ist durch Zugabe von kationischen Tensiden in die Elektrolytlösung möglich, wodurch eine Schicht positiv geladener Ionen zum Kanallinneren hin erzeugt wird, die in einer negativen Grenzschicht im Elektrolyten und damit in einer Bewegung zur Anode resultiert [48]. Bei der Gelelektrophorese gibt es die Möglichkeit, Agarose-Arten und Polyacrylamid zu verwenden, die nur sehr wenige saure Gruppen enthalten und somit keine Elektroosmose hervorrufen [49]. Auf die beweglichen Ionen der Doppelschicht wirkt eine elektrische Kraft. Diese ruft eine Flussgeschwindigkeit hervor, die proportional zum angelegten elektrischen Feld  $E$ , zum Zeta-Potential der Kanalwand  $\zeta_{Wand}$ , zur Oberflächenladung und zur Viskosität  $\eta$  des Elektrolyten ist.

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta_{Wand}}{\eta} E, \quad (2.14)$$

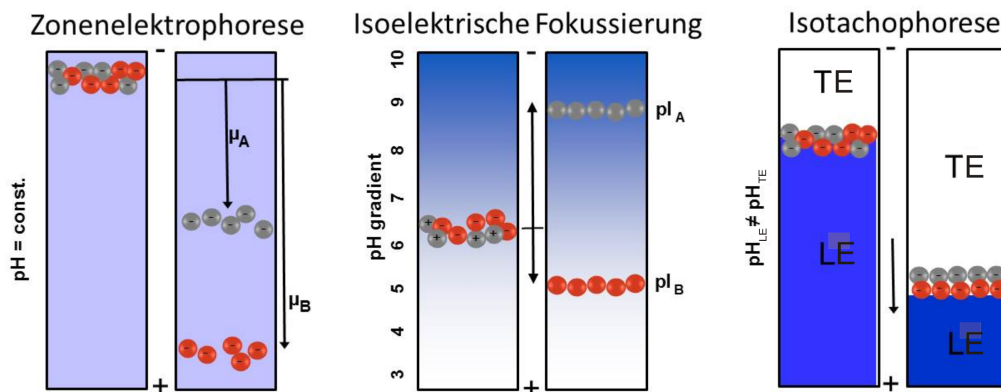
wobei  $\epsilon_0$  die Dielektrizitätskonstante und  $\epsilon_r$  die Permeabilität des Lösungsmittels sind.

## 2. Grundlagen

### 2.3.3. Betriebsmodi der Elektrophorese

Es haben sich drei unterschiedliche Separationsmethoden in der Praxis etabliert:

- Zonenelektrophorese (ZE)
- Isoelektrische Fokussierung (IEF)
- Isotachophorese (ITP)

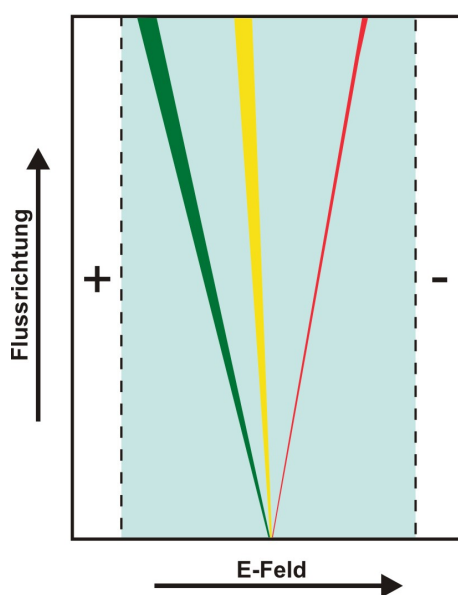


**Abbildung 2.5.:** Trennprinzipien der Elektrophorese: Zonenelektrophorese, Isoelektrische Fokussierung, Isotachophorese. Zonenelektrophorese: Komponenten der zu untersuchenden Probe werden in einem homogenen Puffersystem nach ihrer jeweiligen elektrophoretischen Mobilität  $\mu$  aufgetrennt. Isoelektrische Fokussierung: Komponenten werden in einem Puffersystem mit etabliertem pH-Gradient aufgrund ihres jeweiligen isoelektrischen Punktes ( $\text{pI}$ ) aufgetrennt. Isotachophorese: Komponenten werden in einem diskontinuierlichen Puffersystem aus einem leitenden Elektrolyten (LE) und einem nachlaufenden Elektrolyten (TE) nach ihrer jeweiligen elektrophoretischen Mobilität  $\mu$  aufgetrennt. (nach [45]).

In Abb. 2.5 sind diese schematisch dargestellt. Bei der ZE werden Komponente A und B in einem homogenen Puffersystem nach ihren elektrophoretischen Mobilitäten  $\mu_A$  und  $\mu_B$  voneinander getrennt. Im Gegensatz dazu wird bei der IEF ein pH-Gradient genutzt, um die amphoteren Substanzen A und B bezüglich ihres  $\text{pI}$  aufzutrennen. Wie bei der ZE werden auch bei der ITP die Komponenten nach elektrophoretischer Mobilität separiert, jedoch wird in diesem Fall ein diskontinuierliches Puffersystem bestehend aus einem leitenden Elektrolyten (engl. *leading electrolyte*; LE) und einem nachlaufenden Elektrolyten (engl. *terminating electrolyte*; TE) herangezogen. Die genannten Separationsmethoden werden unter dem Gesichtspunkt der Frei-Fluss-Elektrophorese im Folgenden noch detaillierter aufgegriffen.

### Frei-Fluss-Zonenelektrophorese

Bei dieser Methode wird ein homogenes Puffersystem über den gesamten Separationsbereich eingesetzt, das eine konstante elektrische Leitfähigkeit besitzt. Die zurückgelegte Migrationsstrecke innerhalb eines definierten Zeitraumes ist ein Maß für die elektrophoretische Mobilität der verschiedenen Substanzen. Die Methode kann für amphotere und nicht-amphotere Moleküle angewendet werden. Während des Trennverfahrens können verschiedene Effekte zu Unschärfe der Trennzonen führen, was die Auflösung der Elektrophorese verschlechtert. Bei der *Frei-Fluss-Zonenelektrophorese* (FFZE) wird der zu trennende Analyt linear unter einem konstanten Winkel, der von der elektrischen Feldstärke, der elektrophoretischen Mobilität und der Flussgeschwindigkeit bestimmt wird, abgelenkt (siehe Abb. 2.6). Die Migrati-



**Abbildung 2.6.:** Schematische Darstellung der Frei-Fluss-Zonenelektrophorese. Die Komponenten in der Probe werden in einem homogenen Puffersystem linear unter einem konstanten Winkel, der von der elektrischen Feldstärke, der jeweiligen elektrophoretischen Mobilität und der Flussgeschwindigkeit bestimmt wird, abgelenkt.

onsstrecke  $d$  des durch das elektrische Feld wandernden Analyten ist gegeben durch

$$d = \mu_{ep}Et = v_{ep}t, \quad (2.15)$$

wobei  $\mu_{ep}$  die vorherrschende elektrophoretische Mobilität,  $v_{ep}$  die elektrophoretische Geschwindigkeit (beides individuell für jede Komponente des Molekülgemisches),  $E$  die elektrische Feldstärke und  $t$  die Verweilzeit der Moleküle im Separationsbereich darstellt [12]. Eine hohe Auflösung wird durch schmale Banden der wandernden Analyt-Komponenten mit scharfen Grenzen erzielt.

## 2. Grundlagen

Wie eingangs erwähnt, gibt es Effekte, die sich negativ auf die Auflösung auswirken. Die Breite der eingelassenen Probe bringt eine Standardabweichung  $\sigma_{Einlass}$  mit sich. Außerdem spielen Verbreiterung durch Diffusion ( $\sigma_D$ ), hydrodynamische Verbreiterung ( $\sigma_{HD}$ ), elektrodynamische Verbreiterung ( $\sigma_{ED}$ ), Joule'sche Wärme ( $\sigma_{JW}$ ) und Dispersion durch Leitfähigkeitsunterschiede ( $\sigma_L$ ) eine Rolle [50], [51]. Die Gesamtvarianz  $\sigma_{ges}^2$  einer aufgetrennten Analyt-Bande ist gegeben durch die Summe aller Einzelvarianzen

$$\sigma_{ges}^2 = \sigma_{Einlass}^2 + \sigma_D^2 + \sigma_{HD}^2 + \sigma_{ED}^2 + \sigma_{JW}^2 + \sigma_L^2. \quad (2.16)$$

Ausgedrückt durch die Breite  $w_P$  der eingelassenen Probe, ergibt sich für die Varianz [52]

$$\sigma_{Einlass}^2 = \frac{w_P}{12}. \quad (2.17)$$

Die Breite  $w_P$  der eingelassenen Probe kann relativ einfach mit den benachbarten laminaren Strömungen gesteuert werden, mit denen die Probe hydrodynamisch fokussiert werden kann [4].

Die durch laterale Diffusion bedingte Varianz steht in direktem Zusammenhang zur Verweilzeit  $t$  des Analyten im Separationsraum

$$\sigma_D^2 = 2Dt, \quad (2.18)$$

wobei  $D$  der Diffusionskoeffizient des Analyten ist [38]. Von Vorteil sind also relativ kurze Verweilzeiten  $t$ , wie sie allgemein in miniaturisierten FFE-Systemen angewendet werden. Bei großskaligen FFE-Einheiten ist dies schwer zu realisieren.

Aufgrund des parabolischen Strömungsprofils, das durch den druckgetriebenen Fluss hervorgerufen wird, kommt es zu Regionen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten innerhalb des Separationsbereiches. Moleküle, die sich nahe der Boden- und Deckelplatte aufhalten, verbleiben länger im elektrischen Feld und werden somit stärker abgelenkt als Moleküle, die in der Mitte des Kanals fließen. Das führt zu einer bogenförmigen Deformation der Analytströmung. Numerisch wird dieser Effekt der hydrodynamischen Verbreiterung ausgedrückt durch

$$\sigma_{HD}^2 = \frac{h^2 t}{105D} E^2 \mu_{ep}^2, \quad (2.19)$$

wobei  $h$  die Kanalhöhe darstellt [38]. Daraus folgt, dass ein flacher Trennkanal, wie er bei den mikrofluidischen Einheiten genutzt wird, diesen Effekt reduziert. Wie schon weiter oben beschrieben, führt das elektrische Feld zusammen mit der elektrischen Doppelschicht der Boden- und Deckelplatte des Kanals zum elektroosmotischen Fluss (EOF) innerhalb des Separationskanals. Dieser hydrodynamische Fluss senkrecht zur Separationsachse führt zu ähnlichen Deformationen wie bei der hydrodynamischen Verbreiterung der Banden und wird als *elektrodynamische Verbreiterung* der Banden bezeichnet.



## 2.3. Grundlagen und Theorie der Elektrophorese

Aufgrund des elektrischen Widerstandes der Flüssigkeit innerhalb des Separationskanals erwärmt sich das Separationsmedium bei Stromfluss. Dieser Effekt wird als *Joule'sche Wärme* bezeichnet. Bei konstanter Spannung  $U$  und konstantem Stromfluss  $I$  im Zeitraum  $t$  gilt

$$W = UIt. \quad (2.20)$$

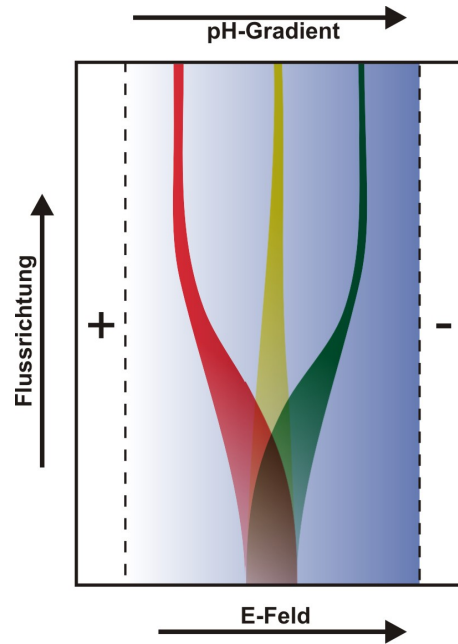
Es entsteht ein Temperatur-Gradient zwischen Boden- und Deckelplatte, der sein Maximum in der Mitte des Kanals hat. Die Temperaturänderung bedingt eine Verminderung der Viskosität im Kanal-Zentrum und beeinflusst stellenweise die elektrophoretische Mobilität. Moleküle desselben Analyten können so unter verschiedenen Winkeln abgelenkt werden, was zu einer Banden-Verbreiterung führt. Im Gegensatz zu großskaligen FFE-Einheiten, die generell aktiv gekühlt werden müssen, ist bei mikrofluidischen FFE-Systemen eine schnelle Wärmeabfuhr gewährleistet, die auch aufgrund der geringeren Stromstärken diese Art der Bandendeformation minimiert.

Durch unterschiedliche Leitfähigkeiten von Analyt und Trägerelektrolyt kommt es zu unterschiedlichen Feldstärken innerhalb der Flüssigkeit. Das führt zu verschiedenen Migrationsgeschwindigkeiten der Moleküle in Bereichen mit unterschiedlicher elektrischer Feldstärke und resultiert in einer Dispersion durch Elektromigration. Mit der Wahl entsprechender Puffersysteme, die die gleiche Leitfähigkeit für Probe und Trägerelektrolyt gewährleisten, kann dieser Effekt reduziert werden [39].

### Frei-Fluss-Isoelektrische Fokussierung

Die *Frei-Fluss-Isoelektrische Fokussierung* (FFIEF) erfolgt bei Anwesenheit eines elektrischen Feldes in einem künstlich gebildeten pH-Gradienten und kann ausschließlich für amphotere Substanzen angewendet werden. Die pH-Gradienten können aus mobilen oder immobilen Zwitterionen-Ampholyten bestehen. Die Moleküle bewegen sich solange zwischen Anode und Kathode bis sie die Position im pH-Gradienten erreichen, an dem ihre Netto-Ladung null beträgt. Wie schon an anderer Stelle erwähnt, wird dieser pH-Wert als *isoelektrischer Punkt* (pI) des jeweiligen Stoffes bezeichnet (in Abb. 2.5 werden die Komponenten A und B mit ihrem jeweiligen pI  $pI_A$  und  $pI_B$  aufgetrennt). Da die Komponenten an diesem Punkt nicht mehr geladen sind, hat das elektrische Feld keinen Einfluss mehr auf sie. Sollten Moleküle ihre Position aufgrund von Diffusion verlassen, erlangen sie wieder eine Ladung und werden vom angelegten elektrischen Feld wieder auf ihren pI gezwungen. Daher auch die Bezeichnung *Fokussierung*. Diffusion stellt also in diesem Fall keinen Störeffekt dar. In Abb. 2.7 ist die Methode der FFIEF dargestellt. Der pH-Gradient verläuft dabei senkrecht zur Flussrichtung. Anders als bei der FFZE, bei der die Standardabweichung jeder Bandenbreite mit fortlaufender Trennung ansteigt, bleibt diese bei der FFIEF konstant, wenn das Gleichgewicht erreicht ist. Bei dieser Methode spielt die Betrachtung der die Fokussierung störenden Effekte und die geringe Löslichkeit der Analyte an ihrem isoelektrischen Punkt eine wichtige Rolle. Die Differentialglei-

## 2. Grundlagen



**Abbildung 2.7.:** Schematische Darstellung der Frei-Fluss-Isoelektrischen Fokussierung. Die Komponenten in der Probe werden in einem Puffersystem, in dem ein pH-Gradient generiert wurde, in Abhängigkeit von ihren jeweiligen isoelektrischen Punkt aufgetrennt.

chung

$$\frac{d(C\mu E)}{dx} = \frac{d}{dx} D \frac{dc}{dx} \quad (2.21)$$

mit der Analytkonzentration  $C$  an Position  $x$  im Trennraum, der elektrophoretischen Mobilität  $\mu$  an diesem Punkt, der elektrischen Feldstärke  $E$  und dem Diffusionskoeffizienten  $D$  gilt unter stationären Bedingungen und beschreibt die Gleichgewichtsbedingungen zwischen gleichzeitigem elektrophoretischen und diffusionsbedingtem Massentransport während der IEF [53]. Um die Qualität eines Systems, wie das der isoelektrischen Fokussierung zu beschreiben, sind die *Standardabweichung der Peak-Breite*  $\sigma$ , die *Auflösung*  $\Delta(pI)_{min}$  und die *Peak-Kapazität*  $n$  nützliche Parameter. Die Lösung der oben genannten Differentialgleichung ergibt eine Gauß'sche Konzentrationsverteilung mit einer Standardabweichung

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{D}{pE}} \quad (2.22)$$

mit dem Diffusionskoeffizienten  $D$ , der elektrischen Feldstärke  $E$  und

$$p = -\frac{d\mu}{d(pH)} \cdot \frac{d(pH)}{dx}, \quad (2.23)$$

wobei  $d(pH)/dx$  den pH-Gradienten beschreibt und  $d\mu/d(pH)$  die Steigung der elektrophoretischen Mobilität des Analyten ist [53]. Die minimale Differenz der isoelektrischen Punkte zweier Substanzen, die getrennt werden können, gibt die Auflösung

## 2.3. Grundlagen und Theorie der Elektrophorese

der IEF an und beträgt  $3\sigma$  [53]:

$$\Delta(pI)_{min} = 3\sigma = 3 \cdot \sqrt{\frac{D(\frac{d(pH)}{dx})}{E(-\frac{d\mu}{d(pH)})}}. \quad (2.24)$$

Nun kann  $d(pH)/dx$  durch  $\Delta pH/L$  ( $L$ : Länge des pH-Gradienten,  $\Delta pH$ : Gesamtdifferenz des erzeugten pH-Gradienten) und  $E = V_{eff}/L$  ( $V_{eff}$ : Spannungsabfall) folgender Zusammenhang gefunden werden:

$$\Delta(pI)_{min} = 3 \cdot \underbrace{\sqrt{\frac{\Delta pH}{V_{eff}}}}_{System} \cdot \underbrace{\sqrt{\frac{D}{-\frac{d\mu}{d(pH)}}}}_{Analyt}. \quad (2.25)$$

Dieser Gleichung kann man entnehmen, dass sich nur die Parameter  $\Delta pH$  und  $V_{eff}$  auf das jeweilige FFE-System beziehen, während die anderen dem Analyt zugeordnet werden. Die Auflösung  $\Delta(pI)_{min}$  ist also unabhängig von der Dimension des Bauteils, aber erhöht sich mit der angelegten Gesamtspannung ähnlich wie bei der FFZE. Eine gute Auflösung wird erreicht durch eine möglichst hohe Spannung und einen schmalen pH-Gradienten. Je kürzer die Kanallänge ist, desto schneller geht auch die Separation von statten, da die Separationszeit linear mit der Kanallänge abnimmt. Zusammenfassend kann man sagen, dass mikrofluidische FFIEF-Systeme vergleichbare und bessere Auflösungen als ihre großskaligen Gegenstücke, erreichen können [39]. Die Anzahl der Peaks, die ein System auflösen kann, wird ausgedrückt durch die Peak-Kapazität  $n$

$$n = \frac{L}{4\sigma} \quad (2.26)$$

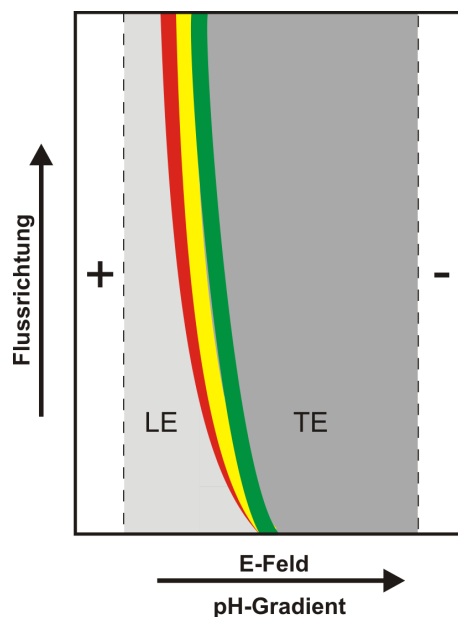
mit der Gesamtlänge  $L$  des pH-Gradienten [54]. Theoretisch ist auch dieser Parameter unabhängig von den Abmessungen des Systems:

$$n = \underbrace{\sqrt{\Delta(pH) \cdot V_{eff}}}_{System} \cdot \underbrace{\sqrt{\frac{-\frac{d\mu}{d(pH)}}{16D}}}_{Analyt}. \quad (2.27)$$

### Frei-Fluss-Isotachophorese

Dies *Frei-Fluss-Isotachophorese* (ITP) macht sich ein diskontinuierliches Puffersystem für die Auftrennung zunutze. Die Ionen bewegen sich alle mit gleicher Geschwindigkeit zwischen einem leitenden Elektrolyten (engl. *leading electrolyte*; LE) mit hoher Mobilität und einem nachlaufenden Elektrolyten (engl. *terminating electrolyte*; TE) mit niedriger Mobilität. Die Konzentration der Analyt-Ionen passt sich der Konzentration des LE an. Die verschiedenen Komponenten werden entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität aufgetrennt und bilden „Säulen“. In Abb. 2.8 ist die Methode der FFITP schematisch dargestellt.

## 2. Grundlagen



**Abbildung 2.8.:** Schematische Darstellung der Frei-Fluss-Isotachophorese. Die Komponenten werden in einem diskontinuierlichen Puffersystem aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten aufgetrennt. Die Komponente mit der höchsten Mobilität folgt direkt dem leitenden Elektrolyten; die Komponente mit der niedrigsten Mobilität wandert direkt vor dem nachlaufenden Elektrolyten.

Die Komponente mit der höchsten Mobilität folgt direkt dem leitenden Elektrolyten; die Komponente mit der niedrigsten Mobilität wandert direkt vor dem nachlaufenden Elektrolyten. Durch die unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten von LE und TE bildet sich ein Feldstärkegradient parallel zum elektrischen Feld aus. Bei Anlegen einer Spannung wandern beide Elektrolyte und die von ihnen eingeschlossenen Analyte mit konstanter Geschwindigkeit in Richtung Anode. Der LE besitzt eine hohe Mobilität, aber eine geringe Feldstärke, der TE dagegen besitzt eine geringe Mobilität, aber eine höhere Feldstärke. An einem Punkt sind die elektrophoretische Geschwindigkeit des Analyten und die des gesamten Elektrolyt-systems gleich, d. h. die relative Geschwindigkeit im Vergleich zum Elektrolyt-system beträgt null. Alle identischen Analyt-Ionen wandern an diese Position im Feldgradienten und es kommt zur Separation und Fokussierung. Verlässt ein Ion diesen Bereich beträgt die Relativgeschwindigkeit nicht mehr null und es wird in Richtung der Separationszone beschleunigt oder abgebremst. Diffusion stellt auch bei dieser Methode keinen Störeffekt dar.

Im Vergleich zu anderen Separationsmethoden fällt die FFITP dadurch auf, dass es keine Abstände zwischen den einzelnen Komponenten gibt. Die fokussierten Bereiche bilden keine „Peaks“ (Gauß-Kurven), sondern Absätze (konzentrationsabhängige Banden).

## 2.4. Biophysikalische Grundlagen

### 2.4.1. Struktur und Konformation der Proteine

Für das in diesem Kapitel behandelte Thema der Struktur und Konformation der Proteine wurde als Grundlage das Buch „Peptide: Chemie und Biologie“ von H. D. Jakubke herangezogen [55].

Proteine bzw. Peptide übernehmen eine Vielzahl von Aufgaben und sind deshalb für alle Lebewesen unverzichtbar. Sie sind für Form und Stabilität der Zellen und des Gewebes verantwortlich (z.B. Kollagen). Sie transportieren lebenswichtige Stoffe, wie Kohlenstoffdioxid und Sauerstoff, durch Lunge und Gewebe (z.B. Hämoglobin) und schützen den Organismus vor Krankheitserregern und körperfremden Substanzen (z. B. durch die Produktion von Immunglobulinen). Andere Proteine, wie z.B. Actin und Myosin, sind für die Bewegung wichtig und die Hormone (z.B. Insulin) sind für die Steuerung und Regelung verantwortlich. Für die Ernährung sind spezielle Speicherproteine von großer Bedeutung; so liefert das Protein Ferritin, das 30% Eisen enthält, der Milz den Hauptvorrat an Eisen. Die größte Gruppe der Proteine stellen die Enzyme (z.B. Ribonuclease) dar, die katalytisch wirken. Einige Proteine wirken auch als Toxine.

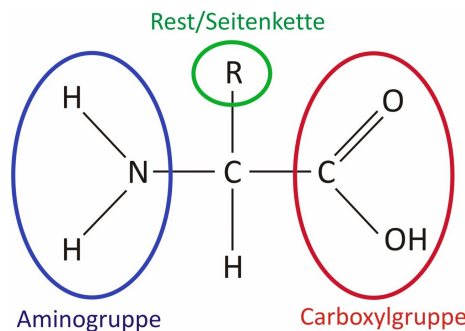
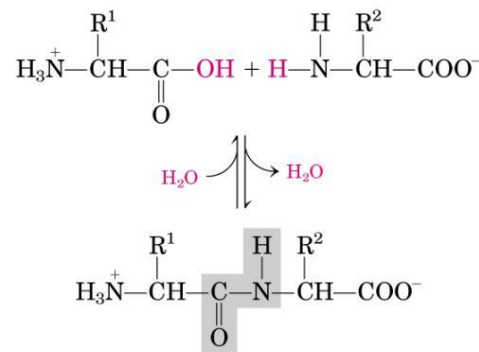


Abbildung 2.9.: Struktur der Aminosäuren

Proteine sind entweder nur aus Aminosäureresten aufgebaut oder weisen zusätzlich noch andere Bestandteile auf. Zu Erstgenannten zählen die *globulären Proteine*. Hierbei handelt es sich um wasserlösliche Proteine, wie Albumine und Globuline und die wasserunlöslichen *Skleroproteine* mit langen Molekülen, etwa Kollagene und Keratine. Zur zweiten Kategorie gehören die *Protein-Komplexe*. Sie bestehen aus einem Proteinanteil und einer proteinfremden Komponente. Entsprechend ihrem proteinfreien Anteil werden sie in *Glykoproteine*, *Lipoproteine*, *Phosphoproteine*, *Metalloproteine* und *Nukleoproteine* eingeteilt [49]. Die Aminosäuren in den Proteinen bestehen aus einer Aminogruppe, einer Carboxylgruppe, einem Wasserstoff- und Kohlenstoffatom und einer Seitenkette, dem sog. Rest (siehe Abb. 2.9). Dieser Rest macht sie voneinander unterscheidbar und ist für ihre biochemische Wirkung verantwortlich.

## 2. Grundlagen

In den Proteinen werden Aminosäuren durch Peptidbindungen zwischen der Aminogruppe einer Aminosäure und der Carboxylgruppe einer anderen Aminosäure kettenförmig zusammengehalten (siehe Abb. 2.10). Peptide mit weniger als zehn Aminosäuren bezeichnet man als Oligopeptide. Polypeptide enthalten weniger als fünfzig Aminosäuren. Proteine sind Makropeptide; sie bestehen aus fünfzig oder mehr Aminosäuren. Globuläre Proteine sind aus zwanzig verschiedenen, natürlich vorkommenden proteinogenen Aminosäuren aufgebaut.



**Abbildung 2.10.:** Bildung einer Peptidbindung unter Abspaltung eines Wassermoleküls [56]

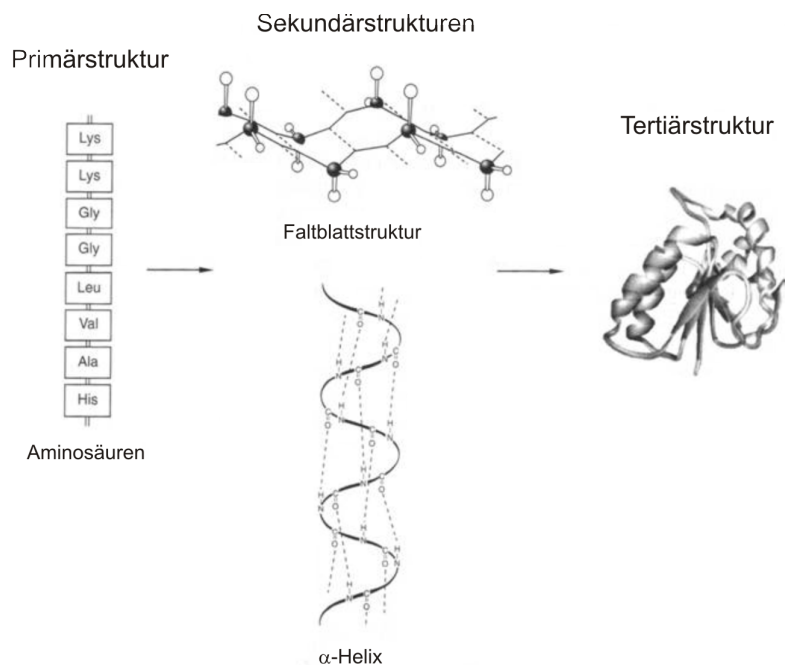
Der strukturelle Aufbau der Proteine wird unterteilt in Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur (siehe Abb. 2.11).

Als *Primärstruktur* eines Proteins bezeichnet man die Reihenfolge bzw. Sequenz der einzelnen Aminosäuren und die räumliche Anordnung benachbarter Struktureinheiten, wodurch die Peptidkette eine Richtung bekommt. Bei linearen Proteinen wird die Aminosäure mit freier  $\alpha$ -Aminogruppe N-terminale Aminosäure genannt und befindet sich auf der linken Seite einer horizontal angeordneten Peptidkette. Auf der rechten Seite der Kette befindet sich die Aminosäure mit freier Carboxylgruppe, welche als C-terminale Aminosäure bezeichnet wird.

Die *Sekundärstruktur* eines Proteins beschreibt die räumliche Anordnung der Ketensequenzen innerhalb eines Makromoleküls. Hierbei ist besonders die Konformationsstabilisierung durch Wasserstoffbrückenbindungen zu beachten. Diese können sich zwischen dem O-Atom und dem N-Atom zweier Peptidbindungen bei einem Abstand von 0,28 nm bilden. Sie resultieren aus den starken intermolekularen Anziehungskräften (Dipol-Dipol-Kräfte) zwischen der relativ stark positiven Teilladung der Wasserstoffatome und der negativen Teilladung der Sauerstoffatome (H-Akzeptor) und Stickstoffatome (H-Donator). Eine Wasserstoffbrücke allein ist im Gegensatz zur kovalenten Bindung relativ schwach. Betrachtet man jedoch die Viel-

## 2.4. Biophysikalische Grundlagen

zahl der Wasserstoffbrückenbindungen in einem Protein versteht man die große Stabilität, die in einem solchen System herrscht. Wegen der sterischen Hinderung durch die Seitenketten kommt es zu einer gegenläufigen Verdrehung der Peptidstrukturen. Daraus resultiert z.B. das  $\beta$ -Faltblatt, bei dem sich die Seitenketten abwechselnd an Ober- und Unterseite befinden.



**Abbildung 2.11.:** Proteinstrukturen: Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur [55].

Eine weiterhin häufig vorkommende Kettenkonformation ist die Helix. Sie hat die Form einer Schraube und wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den Strukturelementen der Peptidbindungen stabilisiert. Alle Helizes haben eine definierte Anzahl von Aminosäuren pro Windung, eine charakteristische Windungshöhe und einen bestimmten Anstieg pro Aminosäure-Rest.

Die *Tertiärstruktur* eines Proteins bezeichnet die nichtperiodischen Faltungen der Peptidkette. Bei der Konformation einer Polypeptidkette spielen nicht nur Wasserstoffbrückenbindungen in den Helizes oder Faltblattstrukturen eine Rolle. Zur Stabilisierung der tatsächlichen Raumstruktur treten weitere Bindungen und Wechselwirkungen auf. So gibt es z.B. neben der Peptidbindung als weitere kovalente Bindung die Disulfidbindung. Diese bildet sich durch Oxidation der SH-Gruppen zweier Cysteinreste. Hierbei können intra- bzw. intermolekulare Disulfidbindungen innerhalb einer oder verschiedener Polypeptidketten entstehen. Neben Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Strukturelementen der Peptidbindung und zwischen trifunktionalen Aminosäurebausteinen kommt es darüber hinaus auch zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen sauren und basischen Aminosäurebestandteilen, die stark von pH-Wert, Salzkonzentration und Dielektrizitätskonstanten des Mediums abhängen.

## 2. Grundlagen

Auch hydrophobe Bindungen und Ionenbindungen spielen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von Peptidkettenkonformationen, die von nicht polaren Bereichen der Aminosäuren hervorgerufen werden und sich nur unter Anwesenheit von Wassermolekülen ausbilden können. Hydrophobe Bindungen entstehen im Inneren eines Proteinmoleküls zwischen den Kohlenwasserstoffgruppen von Valin-, Leucin-, Isoleucin- und Phenylalaninresten. Wasserstoffbrückenbindungen bilden sich zwischen Peptidgruppen oder zwischen Peptidgruppen und polaren Gruppen der Aminosäurereste (-OH, -CONH<sub>2</sub> u.a.). Ionenbindungen sind zwischen positiv geladenen Gruppen in den Lysin-, Arginin- und vereinzelt Histidinresten sowie negativ geladenen Gruppen in den Glutamin- und Asparaginsäureresten existent.

Bei globulären Proteinen sind im Inneren meistens hydrophobe und an der Oberfläche unterschiedlich geladene Gruppen lokalisiert, weshalb sie von außen mit wässrigen Dipolen umhüllt sind, die zur Ausbildung einer Hydrathülle führen. Im Gegensatz dazu besitzen die Proteine biologischer Membranen ihre hydrophoben Gruppen an der Oberfläche und bilden hydrophobe Bindungen zu den umliegenden Lipiden aus. Das macht sie in Wasser unlöslich.

Proteine verhalten sich in gelöster Form amphoter, d.h. sie enthalten sowohl saure als auch basische Gruppen. In sauren Lösungen agieren sie als Polykationen, in basischen Lösungen als Polyanionen. Getragen werden alle Ladungen von den ionisierbaren Gruppen der Aminosäurereste. Liegt eine neutrale wässrige Lösung vor, wird von der Carboxylgruppe eines Asparagin- oder Glutaminsäurerestes ein Proton abgespalten, wodurch an dessen Stelle eine negative Ladung entsteht. Ein Proton kann an die Imidazolgruppe eines Histidinrestes, an die Aminogruppe eines Lysinrestes oder an die Iminogruppe eines Argininrestes binden, mit der Folge, dass diese damit positiv geladen werden. Die Abgabe bzw. Aufnahme eines Protons ist abhängig vom pH-Wert der Lösung. Ist der pH-Wert höher, überwiegt die Abgabe, ist er niedriger, überwiegt die Aufnahme. Die Proteinstruktur sowie der Puffer haben Einfluss auf die Zahl der Ladungen des Proteins. Von Bedeutung ist dabei die Anzahl der Aminosäurereste, die ionisierbare Gruppen tragen und, ob diese im Inneren oder auf der Oberfläche des Moleküls liegen. Beim Puffer sind pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur entscheidend. Die elektrophoretische Mobilität von nativen und auch denaturierten Proteinen wird von ihren Massen, die von der Anzahl der Monomere abhängen, und ihren Ladungen bestimmt. Es muss unterschieden werden zwischen *Nettoladung* und *Gesamtladung* eines Polyions. Die Nettoladung eines Proteins ist gegeben durch

$$Q_i = z_i e, \quad (2.28)$$

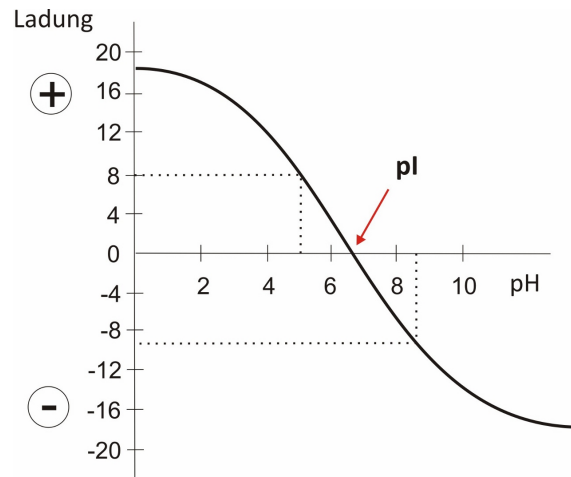
wobei  $z_i$  die Gesamtzahl der Protonladung des geladenen Teilchens  $i$  sowie des Absorptionsteils seiner Ionenatmosphäre und  $e$  die Ladung des Protons ( $e = 1,602 \cdot 10^{-19}$ ) sind. Bei der Nettoladung werden auch die Gegenionen im Puffer berücksichtigt, die sich nach dem Modell von Stern auf der Oberfläche von Polyionen adsorbieren. Sie stellen den fixierten Teil der Ionenatmosphäre dar. Je höher also die Ionenstärke der Lösung ist, desto kleiner ist die Nettoladung. Die Gesamtladung beschreibt die Summe aller elektrischen Ladungen, die das Polyion trägt, worunter



die Ladungen von Aminosäureresten, Metallionen, Cofaktoren usw. fallen.

### Der isoelektrische Punkt eines Proteins

Es gibt für jedes Protein einen bestimmten pH-Wert, bei dem die Anzahl der positiven und negativen Ladungen des Proteins gleich groß ist und es folglich keine Gesamtladung mehr trägt. Dieser pH-Wert wird als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet und ist für jedes Protein spezifisch (siehe Abb. 2.12). Wird während einer



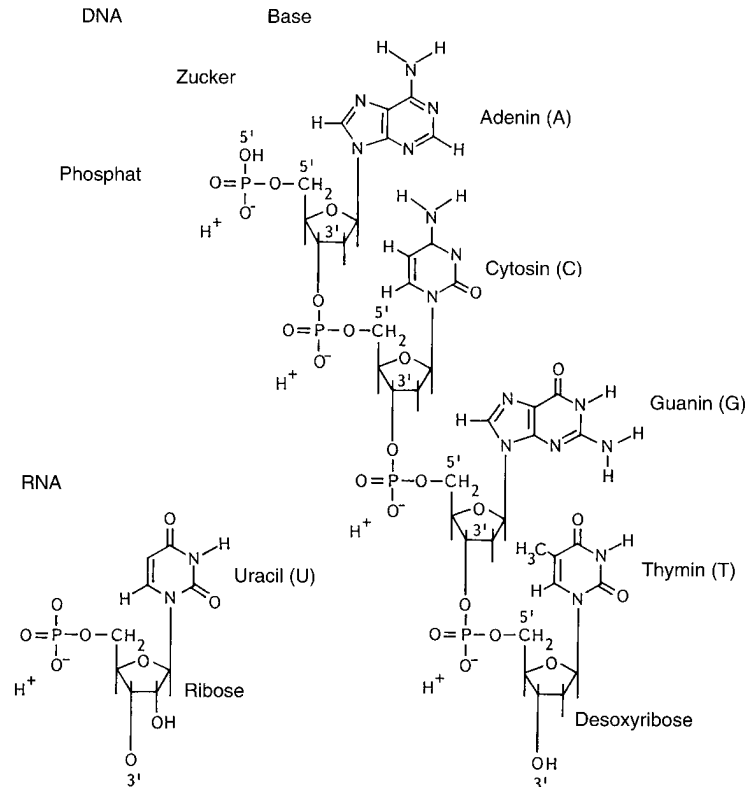
**Abbildung 2.12.:** Nettoladung eines Protein-Polyions als Funktion des pH-Wertes des Puffers. Die Funktion schneidet die Abszissenachse im isoelektrischen Punkt des Proteins. Bei  $\text{pH}=5$  hat das Protein 8 positive Ladungen, bei  $\text{pH}=8,5$  hat es 9 negative Ladungen.

elektrophoretischen Trennung dieser pI-Wert erreicht, wandert das Protein im elektrischen Feld nicht mehr weiter. Durch die fehlende Nettoladung kann sich keine elektrische Doppelschicht ausbilden. 95% der Proteine haben einen pI im pH-Bereich 3-10 [57]. Steigt die Temperatur, so nehmen die pI-Werte ab [58]. Bei z.B.  $25^{\circ}\text{C}$  können sie um bis zu 0,6 pH-Einheiten niedriger sein als bei  $4^{\circ}\text{C}$  [59]. Im basischen pH-Bereich fällt dieser Effekt stärker ins Gewicht als im sauren pH-Bereich, da die Aminogruppen stärker temperaturabhängig sind als die Carboxylgruppen.

### 2.4.2. Struktur und Konformation der Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind Makromoleküle, deren Bausteine als Mononukleotide bezeichnet werden, die jeweils aus dem Einfachzucker *Desoxyribose*, einem Phosphorsäureester und einer Nukleinbase bestehen und Polynukleotidketten bilden (siehe Abb. 2.13). Die Desoxyribose- und Phosphorsäure-Untereinheiten bilden das Rückgrat des Moleküls. Die fünf Kohlenstoff-Atome einer Desoxyribose sind von 1' bis 5' durchnummeriert, wobei die Base am 1'-Ende gebunden ist, der Phosphorsäurerest am 5'-Ende

## 2. Grundlagen

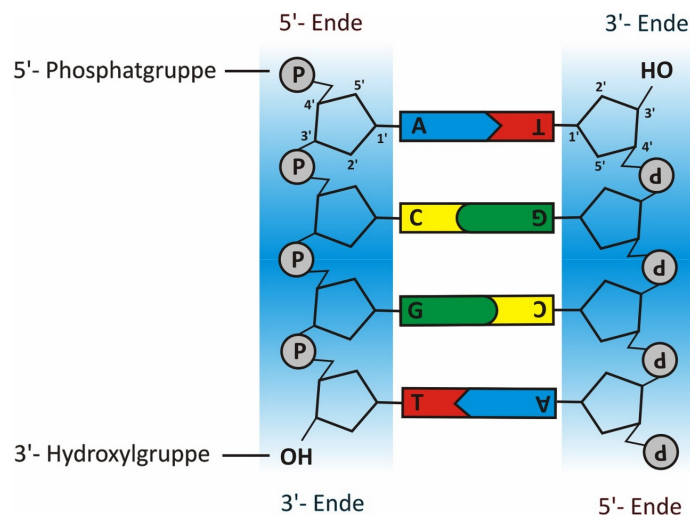


**Abbildung 2.13.:** Die Bestandteile der Nucleinsäuren. In der DNA sind die Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin vertreten, in der RNA wird Thymin durch Uracil ersetzt. DNA enthält den Zucker 2-Desoxyribose, RNA dagegen enthält Ribose. DNA und RNA enthalten Phosphat. Das Rückgrat der DNA besteht aus einer alternierenden Kette aus Phosphat und Zucker. Die Phosphatgruppen ionisieren leicht und spalten ein  $\text{H}^+$  ab, weshalb DNA und RNA sauer reagieren und negativ geladen sind [61].

und die OH-Gruppe an der 3'-Position. Über Phosphodiester-Bindungen werden die Nucleotide in den Ketten zusammengehalten, die einen Phosphorsäurerest darstellen, der die 3'-OH-Gruppe eines Mononucleotidrestes mit der 5'-Phosphatgruppe eines benachbarten Mononucleotidrestes verbindet. Deshalb besitzt jeder DNA-Einzelstrang ein 5'-Ende und ein 3'-Ende (siehe Abb. 2.14). Aufgrund der negativen Ladung und der damit verbundenen Hydrophilie der Phosphorsäurereste ist das gesamte DNA-Molekül negativ geladen und wandert im elektrischen Feld immer zur Anode. Der pI von DNA liegt bei ca. 5,0 [60]. Die in den Nucleotiden vorhandenen Basen sind zum Einen die Purin-Basen Adenin und Guanin und zum Anderen die Pyrimidin-Basen Cytosin, Uracil und Thymin. In den *Desoxyribonucleinsäuren* (DNA) ist das Uracil nicht vorhanden, in den *Ribonucleinsäuren* (RNA) fehlt das Thymin. In der Regel kommt DNA als schraubenförmige Doppelhelix vor, wie schon WATSON und CRICK im Jahr 1953 in ihrem DNA-Modell darstellten [62]. Auf-

## 2.4. Biophysikalische Grundlagen

grund der Aneinanderlagerung zweier Einzelstränge in einer Doppelhelix sind immer zwei Basen gepaart. Die Helix hat einen Durchmesser von 2 nm mit 10 Basenpaaren pro Windung. Die Zucker-Fünfatomringe und die Phosphodiester-Brücken befinden sich auf der Außenseite des Moleküls. Der Abstand zwischen den Strängen ist an jeder Position gleich, da immer Pyrimidin mit Purin kombiniert wird. Senkrecht zur Helixachse liegen die Basenpaare, wobei sich immer nur Adenin und Thymin (mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen) oder Guanin und Cytosin (mit drei Wasserstoffbrückenbindungen) paaren. Stabilisiert wird die Doppelhelix außerdem durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den übereinanderliegenden Basen. DNA-Polynukleotidketten können rechts- und linksorientierte Helizes bilden. Eine



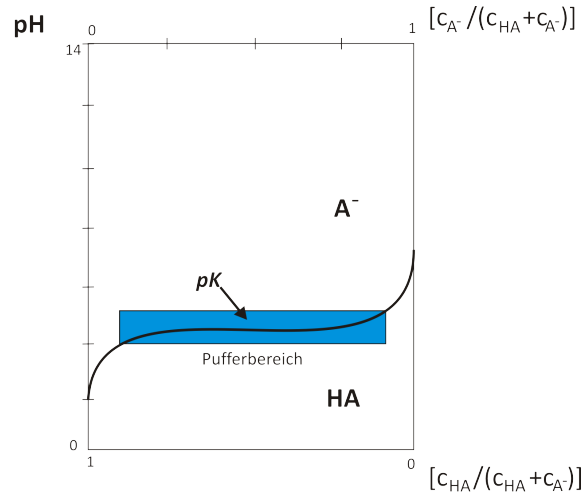
**Abbildung 2.14.:** Schema des Ausschnittes einer DNA-Doppelhelix.

linksgewundene Helix wird als Z-Konformation bezeichnet und hat einen Anteil von weniger als einem Prozent der Chromosomenstruktur in Eukaryonten (Lebewesen mit Zellkern und Kernmembran). Die DNA ist Bestandteil eines jeden Lebewesens und trägt die Erbinformation in sich. Die in ihr enthaltenen Gene tragen die Information für die Herstellung der RNA. Die *messenger-RNA* (*mRNA*), eine Untergruppe der RNA, trägt wiederum die Information für den Aufbau der Proteine. Die Abfolge der Basen innerhalb der Gene bestimmt die Abfolge der Aminosäuren des jeweiligen Proteins, wobei immer drei Basen eine Aminosäure festlegen. Polynukleotidketten mit komplementären Basensequenzen können sich zu Doppelhelizes verbinden (*Hybridbildung*). Das können zwei DNA-Polynukleotidketten oder eine DNA- und eine RNA-Polynukleotidkette sein. Wie bei den Proteinen bestimmen auch bei den Nucleinsäuren die Massen und Ladungen deren elektrophoretische Mobilität und es gilt Gleichung 2.28.

## 2. Grundlagen

### 2.4.3. Pufferchemie

Bei elektrophoretischen Trennungen, außer bei der isoelektrischen Fokussierung, ist ein konstanter pH-Wert erforderlich, da nur so eine wichtige Voraussetzung für die Elektrophorese gewährleistet ist, nämlich dass die elektrischen Ladungen der Polyionen unverändert bleiben. Dafür werden Pufferlösungen eingesetzt, die nach



**Abbildung 2.15.:** Schematische Darstellung der Titrationskurve einer Säure HA und ihrer konjugierten Base  $A^-$  in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung. Die Henderson-Hasselbach-Gleichung beschreibt den Verlauf der Kurve. Bei gleichen Konzentrationen von HA und  $A^-$  ist der pH-Wert gleich dem  $pK_s$ -Wert.

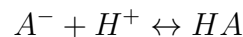
*BRÖNSTEDT* als Lösungen von schwachen Basen und ihren konjugierten Säuren dargestellt werden. Bei Betrachtung der Titrationskurven stellt sich ein Plateaubereich (Pufferzone) dar, der sich über bis zu 1,5 pH-Einheiten erstreckt (siehe Abb. 2.15). Gibt man in diesem Bereich Basen oder Säuren zur Pufferlösung hinzu oder verdünnt die Lösung, verändert sich der pH-Wert nur minimal. Für die Puffer gilt die Gleichung von Henderson-Hasselbach

$$pH = pK_s + \log \frac{[\text{Base}]}{[\text{Säure}]}$$

Bei jedem Puffer wird der Gleichgewichtsprozess



angenommen. Bei Zugabe einer starken Säure, wird der Gleichgewichtsprozess durch

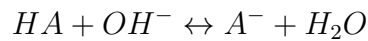


beschrieben. Die zugehörige Gleichung lautet

$$pH = pK_s + \log \frac{[A^-] - [H^+]}{[HA] + [H^+]}. \quad (2.29)$$

## 2.5. Grundlagen der Immunoassays und ihre Methoden

Mit Zugabe einer starken Base geht der Gleichgewichtsprozess



mit zugehöriger Gleichung

$$pH = pK_s + \log \frac{[A^-] + [H^+]}{[HA] - [H^+]} \quad (2.30)$$

einher. Ist die Konzentration der zugeführten Säure oder Base niedriger als die der puffernden Base  $[A^-]$  und puffernden Säure  $[HA]$  verändert sich der pH-Wert des Puffers nur unwesentlich. Bei Verdünnung der Pufferlösung verändern sich zwar die Konzentrationen von Säure und Base, nicht aber das Verhältnis  $[A^-]/[HA]$ . Auch hier ergibt sich fast keine Veränderung des pH-Wertes.

Die *Pufferkapazität*  $\beta$  ist die wichtigste Eigenschaft eines Puffers. Sie ist das Verhältnis der Änderung der Konzentration von Puffer-Base oder -Säure und der Änderung des pH-Wertes des Puffers

$$\beta = \frac{dc_A}{dpH}, \quad (2.31)$$

mit der Basen-Konzentration  $c_A$ . Daraus ergibt sich

$$\beta = \ln 10 \frac{[A^-][HA]}{[A^-] + [HA]}. \quad (2.32)$$

Eine optimale Pufferkapazität ist erreicht, wenn  $pH = pK_s$ .

## 2.5. Grundlagen der Immunoassays und ihre Methoden

Als Grundlage für dieses Kapitel wurde das Buch „Immunoassays“ von A. M. Raem und P. Rauch [30] herangezogen.

Immunoassays sind aus dem Laboralltag nicht mehr wegzudenken. Die Gründe hierfür liegen hauptsächlich in der schnellen und unkomplizierten Durchführung der Assays und der Möglichkeit, aus einer großen Anzahl unterschiedlicher Substanzen einen bestimmten Stoff nachzuweisen. Als Nachweismoleküle werden Antikörper eingesetzt, die die gesuchte Substanz innerhalb eines heterogenen Molekülgemisches identifizieren können und reversibel binden, jedoch mit sehr niedriger Dissoziationskonstante. Für die Detektion und Auswertung des gebundenen Systems aus Antikörper und Analyt wird an einem anderen Teil des Antikörpers zusätzlich ein Markermolekül gebunden. Dieses Verfahren bietet eine Alternative zur klassischen Analytik, die für das Auffinden und Detektieren eines Analyten aufwendige Methoden benötigt, um Stoffgemische anhand ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften aufzutrennen.

## 2. Grundlagen

Die Immunität eines Wirbeltierorganismus wird durch das Immunsystem gewährleistet, dessen Komponenten über den gesamten Organismus verteilt sind. Es bietet Schutz vor körperfremden Materialien, indem es sie identifiziert und neutralisiert bzw. beseitigt sie anschließend. Bei körperfremden Strukturen handelt es sich z.B. um infektiöse Mikroben, wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten bzw. deren jeweilige Toxine [63]. In manchen Fällen kommt es vor, dass ein Organismus unfähig ist, körpereigene Strukturbestandteile zu erkennen und sie als körperfremd identifiziert. Es wird also körpereigenes Gewebe vom Immunsystem bekämpft (Autoimmunität). Unter die Autoimmunerkrankungen fallen z.B. rheumatische Arthritis, Schuppenflechte und Multiple Sklerose [63].

Eine sehr wichtige Rolle im Immunsystems spielen die Antikörper, welche die ersten spezifischen Produkte der Immunantwort waren, die wissenschaftlich identifiziert wurden. Deren Bildung stellt die Abwehrreaktion des Immunsystems auf die sogenannten Antigene dar. Als Antigene bezeichnet man die Stoffe, die beim Eindringen in einen Organismus eine Immunreaktion auslösen im Zuge derer Antikörper oder reagierende Immunzellen gegen die eindringenden Substanzen gebildet werden.

Man unterscheidet zwischen zwei Systemen: dem angeborenen, unspezifischen Immunsystem und dem adaptiven, spezifischen Immunsystem. Das angeborene Immunsystem bietet gleich beim ersten Kontakt mit dem körperfremden Stoff, dessen Strukturen in diesem Fall dem Immunsystem schon sehr früh in der Entwicklung als körperfremd bekannt waren, Schutz. Dazu zählen außerdem physiologische Barrieren, wie Schleimhäute, der saure pH-Wert des Schweißes und des Magens, sowie das Lysozym in der Tränenflüssigkeit [63, 30]. Die sogenannten Phagozyten sind die Zellen des angeborenen Immunsystems, die in Monozyten/Makrophagen und Granulozyten unterteilt werden. Während Granulozyten bei der Vernichtung der Antigene sterben, überleben Monozyten/Makrophagen mehrere Wochen und können weiterhin körperfremdes Material aufnehmen. Monozyten halten sich in den Gefäßen auf. Wandern sie von dort unter Änderung ihrer Morphologie ins Gewebe, werden sie als Makrophagen bezeichnet. Durch die erste Immunreaktion des angeborenen Immunsystems werden andere Immunzellen angelockt und aktiviert.

Zusätzlich zum unspezifischen Immunsystem setzt die adaptive Immunantwort ein, die eine anhaltende Immunität des Organismus gegenüber Antigenen sicherstellt. Dieses sogenannte *immunologische Gedächtnis*, das sich die Antigene „merkt“, kann beim erneuten Kontakt mit diesen noch effektiver reagieren. Im Zusammenspiel beider Systeme kann Fremdmaterial wirksam unschädlich gemacht werden. Als Zellen des adaptiven Immunsystems agieren die sogenannten B- bzw. T-Lymphozyten. T-Lymphozyten reifen im Thymus, einem großen lymphatischen Organ im oberen Brustbereich heran, während B-Lymphozyten sich im Knochenmark entwickeln. Sogenannte naive Lymphozyten, die noch nie Kontakt mit ihrem Antigen hatten, befinden sich auf einem ständigen Rundgang durch den Körper. Dieser Vorgang ist notwendig, damit die Antigene von den Antikörpern, die für sie spezifisch sind, gefunden werden können. Kommt ein Antigen mit einem B-Lymphozyten, der den entsprechenden Antikörper als Rezeptor auf seiner Oberfläche trägt, in Kontakt, wird die adaptive Immunantwort ausgelöst. Antikörper und Antigen gehen dabei eine spezi-

## 2.5. Grundlagen der Immunoassays und ihre Methoden

fische, nichtkovalente Bindung ein. Dadurch wird eine Kettenreaktion ausgelöst. T-Lymphozyten scheiden Signalstoffe ab, die notwendig sind, um die B-Lymphozyten zu aktivieren und regen sie an, sich mehrfach zu teilen, um die Antigene in ausreichender Anzahl bekämpfen zu können. Dieser Vorgang wird als *klonale Expansion* bezeichnet. In einem weiteren Schritt entwickeln sich die Tochterzellen zu Plasmazellen, die lösliche Antikörper erzeugen.

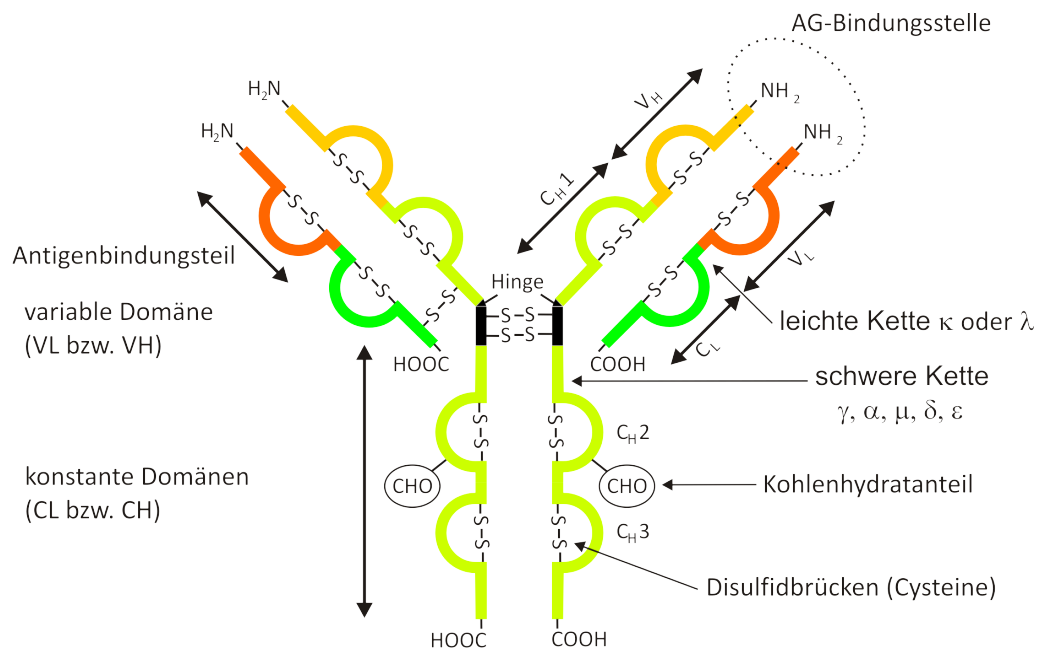
Die Möglichkeiten der Antikörper, gegen die Antigene vorzugehen, sind vielfältig. Zum Einen können sie die Antigene neutralisieren, indem sie eine Bindung mit ihnen eingehen und sie so an einer weiteren Verbreitung im Körper hindern. Überziehen (opsonieren) die Antikörper die Antigene, erkennen die Makrophagen diese als körperfremd, phagozytieren sie und bauen sie schließlich ab. Zum Anderen gibt es die Möglichkeit, dass Antikörper der Klassen Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM) das Komplementsystem aktivieren, indem gebundene Antikörper die Funktion eines „Rezeptors“ für das erste Protein des Komplementsystems übernehmen, welches auf der Oberfläche des Erregers einen Proteinkomplex erzeugt, der den Erreger lysiert. Die Phagozyten und auch das Komplementsystem sind selbst nicht antigenspezifisch, sondern werden lediglich von den spezifischen Antikörpern, die die Antigene markieren, „angelockt“. Erst dann können die Phagozyten diese aufnehmen, abbauen und aus dem Organismus entfernen. Da nach der erfolgreichen Beseitigung eines Antigens einige B-Lymphozyten als Gedächtniszellen fungieren, steht beim zweiten Kontakt mit dem entsprechenden Antigen eine größere Menge an spezifischen Immunzellen zur Verfügung. Bei der primären Immunantwort, die beim ersten Kontakt mit dem Antigen eintritt, produziert das Immunsystem nach ca. fünf Tagen Antikörper. Jede weitere Immunantwort führt zu einer schnelleren Produktion der Antikörper in einer immer höheren Konzentration. Zusätzlich wird durch Hypermutation die Affinität der Antikörper mit jeder Immunantwort erhöht. Dabei findet eine Mutation auf DNA-Ebene statt, was eine leichte Veränderung der Antikörper zur Folge hat. Beim erneuten Kontakt mit dem entsprechenden Antigen teilen sich hauptsächlich die B-Lymphozyten, deren an ihrer Oberfläche befindliche Antikörper das Antigen hochaffin binden können.

Aufgrund der beteiligten Komponenten wird das adaptive Immunsystem in *humoral* (lat. *humor*=Flüssigkeit) und *zellulär* unterteilt. Die humorale Immunabwehr bezieht sich auf Elemente, die sich in Körperflüssigkeiten befinden. Diese umfassen die löslichen Antikörper, die durch die B-Lymphozyten produziert werden. Lösliche Antikörper binden wiederum nur Antigene, die sich nicht in Zellen, sondern auch in Körperflüssigkeiten aufhalten. Die Antigene, die sich durch ihren Aufenthaltsort in Körperzellen dem Angriff von löslichen Antikörpern entziehen, werden von bestimmten T-Lymphozyten bekämpft. Diese sind die Elemente der zellulären Immunabwehr. Sie suchen die Oberfläche von Zellen nach Fremdmaterial ab und steuern mit der Ausschüttung von bestimmten Signalstoffen (Lymphokine) andere T-Lymphozyten und B-Lymphozyten.

## 2. Grundlagen

### 2.5.1. Struktur und Funktion der Antikörper

Antikörper sind lösliche Immunglobuline des Blutplasmas und werden den Glykoproteinen zugeordnet. Sie übernehmen unterschiedliche Aufgaben im Organismus, etwa die Vermittlung der spezifischen Bindung an das Antigen und die dadurch ausgelösten Effektormechanismen, zu denen unter anderem die Hauptfunktionen Opsonisierung, Komplementaktivierung, antikörpervermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-cytotoxicity - ADCC*) und Signaltransduktion gehören. Jeder Organismus ist in der Lage, mindestens  $10^8$  verschiedene Antikörper zu bilden, wobei jede Antikörperklasse dabei in minimaler Konzentration vorliegt. Der Aufbau eines Immunglobulin-Moleküls ist in Abb. 2.16 dargestellt. Jedes Antikörpermolekül be-



**Abbildung 2.16.:** Schematischer Aufbau eines Immunglobulin-Moleküls (nach [30]).

steht in seiner Grundstruktur aus zwei identischen schweren Ketten (*heavy chains*) und zwei identischen leichten Ketten (*light chains*) und wird in Abbildungen meistens schematisch als „Y“ mit zwei kurzen und einem langen Arm dargestellt, was mit der tatsächlichen molekularen Struktur der meisten Immunglobuline übereinstimmt.

Am Übergang der leichten Ketten zu den schweren Ketten bilden die schweren Ketten die sogenannte *Hinge-Region*, eine strukturell sehr bewegliche Region, die als eine Art Scharnier fungiert und je nach Isotyp aus 10-60 Aminosäuren aufgebaut ist. Jede der leichten und schweren Ketten besteht aus globulären Domänen, die jeweils aus 105 - 110 Aminosäuren aufgebaut sind. Dabei tragen die schweren Ketten vier oder fünf und die leichten Ketten zwei dieser Domänen. Die einzelnen Domänen, die jeweils aus zwei gegeneinandergelagerten  $\beta$ -Faltblattstrukturen bestehen, werden über jeweils eine durch zwei Cystein-Reste gebildete kovalente Disulfidbrücke stabilisiert. Die schweren Ketten und jeweils eine schwere und eine



## 2.5. Grundlagen der Immunoassays und ihre Methoden

leichte Kette sind sowohl über nichtkovalente Kräfte als auch über kovalente Disulfidbrücken miteinander verbunden und werden so stabilisiert. Die schweren Ketten haben ein Molekulargewicht von jeweils 55 kDa – 70 kDa, die leichten von jeweils 24 kDa – 25 kDa.

Für die spezifische Antigenbindung ist der N-terminale Teil der Ketten zuständig, insbesondere die hypervariablen Regionen (*complementary determining regions - CDRs*). Aufgrund der immensen Variabilität zwischen den unterschiedlichen Immunglobulin-Molekülen wird dieser Teil auch als variabler Teil V bezeichnet (VH bei den schweren und VL bei den leichten Ketten). Durch die schon erwähnte Hinge-Region kann das Antikörper-Molekül durch Auf- und Zuklappen der kurzen Arme Bindungsstellen freigeben und somit „aktivieren“. An die VH- und VL-Domänen gliedern sich die konstanten Domänen C an. Bei den leichten Ketten handelt es sich dabei um eine Domäne (CL) und bei den schweren Ketten um drei oder mehr (je nach Isotyp) Domänen ( $C_1H$ ,  $C_2H$  usw.).

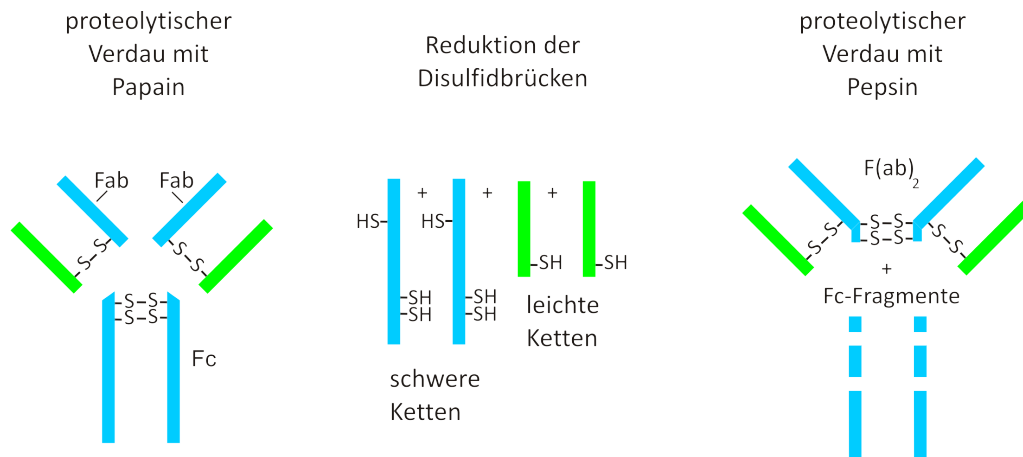
### Enzymatische Spaltung von Immunglobulinen

Trotz der sehr gut ausgeprägten Resistenz der Immunglobuline gegen proteolytischen Verdau können Aminosäureverbindungen an der Hinge-Region durch Papain oder Pepsin aufgetrennt werden. Aufgrund dieser spezifischen enzymatischen Spaltung wird eine Charakterisierung in verschiedene Fragmente ermöglicht. Bei einer Behandlung mit Papain entstehen zwei monovalente  $F_{ab}$  (*fragment antigen-binding*)-Fragmente, die jeweils eine Antigenbindungsstelle tragen und den kompletten leichten Ketten entsprechen, sowie ein  $F_C$  (*fragment constant*)-Fragment, das aus den Resten der schweren Ketten besteht und für die einzelnen Isotypen spezifisch und konstant ist. Es enthält die Bindungsstellen für die sekundären Effektorfunktionen, d.h. für Komplementfaktoren und  $F_C$ -Rezeptoren. Wird Pepsin eingesetzt, führt das zu einem bivalenten  $F_{(ab)_2}$ -Fragment, das beide Antigenbindungsstellen trägt, und einem mehr oder weniger verdauten  $F_C$ -Fragment (siehe Abb. 2.17). Es gibt einen entscheidenden Vorteil bei der Verwendung von  $F_{ab}$  bzw.  $F_{(ab)_2}$ -Fragmenten im Gegensatz zu kompletten Antikörpern: Ein solches Immunglobulin-Molekül kann aufgrund der Gelenkregion zwischen zwei konstanten Domänen der schweren Ketten und der damit verbundenen Flexibilität der beiden Antikörper-Arme zueinander zwei identische Antigene binden, jedoch verschwindet das oft erzeugte Hintergrundsignal, welches durch die Bindung von  $F_C$ -Teilen der Antikörpern an  $F_C$ -Rezeptoren anderer Zellspezies oder Komplementfaktoren zustande kommt.

### Die unterschiedlichen Isotypen der Immunglobuline

Durch den  $F_C$ -Teil werden nach der spezifischen Erkennung und Bindung von Antikörper und Antigen wichtige immunologische und physiologische Effekte hervorgerufen. Da strukturelle Unterschiede der  $F_C$ -Teile unterschiedlichen Funktionen bewirken, werden Immunglobuline in Isotypen klassifiziert.

## 2. Grundlagen



**Abbildung 2.17.:** Enzymverdauung von Immunglobulinen mit Papain oder Pepsin und Reduktion der Disulfidbrücken (nach [30]).

In den Organismen der meisten Wirbeltiere existieren die fünf verschiedenen Hauptklassen IgG, IgA, IgM, IgD und IgE der Immunglobuline. Sie werden anhand der unterschiedlichen Gen-Abschnitte der konstanten Regionen ihrer schweren Ketten eingeteilt (siehe Abb. 2.18). Diese werden als  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  bezeichnet. Die leichten Ketten werden in  $\kappa$  und  $\lambda$  unterteilt. Zusätzlich lassen sich für die Isotypen IgG und IgA Untergruppen festlegen. Beim Menschen differenziert man die Untergruppen IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub> sowie IgA<sub>1</sub> und IgA<sub>2</sub>. Bei der Maus unterscheidet man zwischen IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> und IgG<sub>3</sub>. Alle Isotypen können in einer löslichen Form als auch in einer membrangebundenen Form vorkommen. Die Eigenschaften der fünf Hauptgruppen der Immunglobuline werden nachfolgend genauer dargelegt.

**Immunglobulin G (IgG)** stellt mit etwa 75% (700 – 1600 mg/dl) und einer biologischen Halbwertszeit von 11-70 Tagen die größte Menge des Gesamt-Immunglobulin im Serum dar [64]. Das Molekulargewicht beträgt 150 kDa. Es wird bei einer Erstinfektion erst nach drei Wochen gebildet, bei einer Zweitinfektion jedoch sofort (sekundäre Immunreaktion). Es kann als einziger Isotyp durch einen aktiven Transportmechanismus die Plazenta durchdringen, in den Fötus gelangen und diesen pränatal vor Infektionen schützen. Postnatal kann es vom Säugling über die Muttermilch aufgenommen werden. IgG kann, abhängig vom Isotyp, an F<sub>C</sub>-Rezeptoren auf Makrophagen binden und den klassischen Komplementweg aktivieren. Es hat sich als der unproblematischste Antikörper für *in vitro*-Tests erwiesen und findet deswegen auch verbreitet Anwendung in diesem Bereich.

**Immunglobulin M (IgM)** ist mit einem Anteil von etwas 10% (40 – 280 mg/dl) im Serum vertreten. Es wird sofort beim ersten Kontakt mit einem Erreger gebildet (primäre Immunantwort) und hat eine biologische Halbwertszeit von 5 Tagen [64]. IgM bildet neben der klassischen monomeren Struktur eine komplexe Struktur. Es

## 2.5. Grundlagen der Immunoassays und ihre Methoden

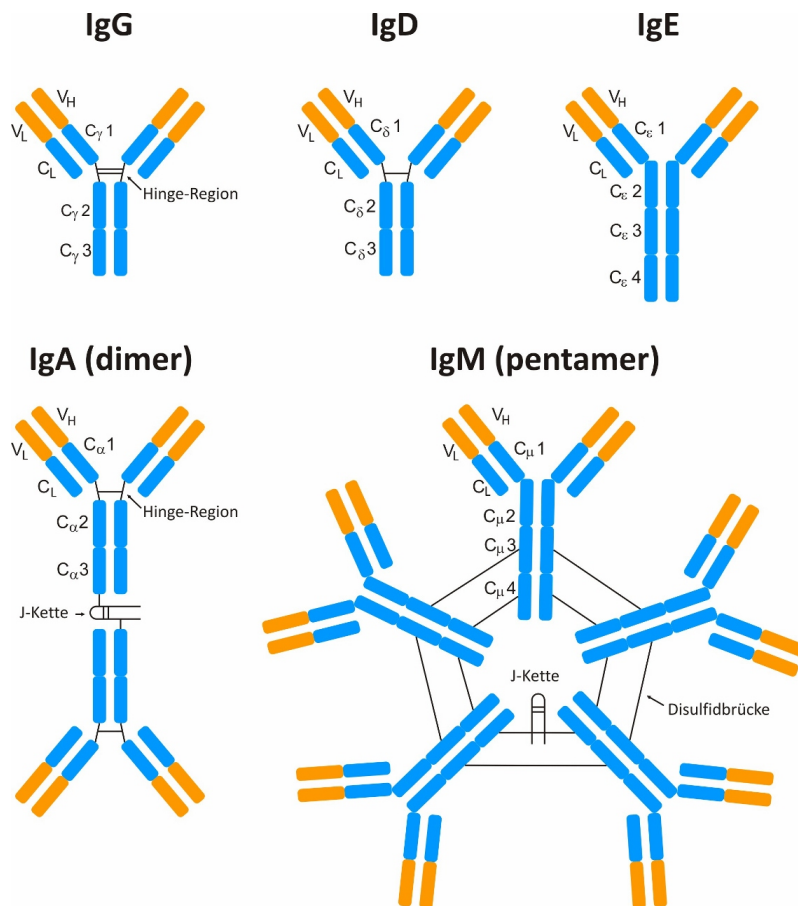


Abbildung 2.18.: Isotypen der Immunglobuline (nach [30])

tritt löslich als Pentamer mit zehn Antigen-Bindungsstellen auf, was zu einem Molekulargewicht von etwa 900 kDa führt. Dabei schließen sich fünf Monomere über eine sogenannte *Joining* (J-Kette) zusammen. Diese stabilisierende Polypeptidkette kommt speziell in menschlichem *IgA*<sub>2</sub>-Dimer und *IgM*-Pentamer vor. *IgM* ist als Monomer das am häufigsten vorhandene Immunglobulin auf der Oberfläche der B-Zellen. Wird *IgM* im Serum gegen ein spezifisches Antigen nachgewiesen, deutet das auf eine frische Infektion innerhalb der letzten Monate hin, was in der viralen Infektions-Diagnostik von entscheidender Bedeutung sein kann. Einige Wochen nach Beginn der Infektion sinkt die Produktion von *IgM* ab und es wird verstärkt *IgG* gebildet, welches einen speziellen Schutz bietet. Aufgrund dieses Mechanismus können gezielte Aussagen über das Stadium der Infektion getroffen werden. Bei einem ersten Nachweis von *IgG*-Antikörpern besteht der Verdacht auf eine Infektion durch einen bestimmten Erreger. Ein Anstieg in der *IgM*-Konzentration lässt auf eine Erstinfektion schließen, bleibt die Konzentration gering, ist es eine Zweitinfektion. Ein Absinken der *IgM*-Konzentration deutet darauf hin, dass die akute Phase einer Infektion überwunden ist.

## 2. Grundlagen

**Immunglobulin A (IgA)** nimmt mit 2/3 der Gesamt-Immunglobulinproduktion den größten Anteil im Körper ein, jedoch beträgt der Anteil im Serum nur 10 – 15 % (70 – 380 mg/dl). Es hat eine biologische Halbwertszeit von 5-6 Tagen [64]. Das Molekulargewicht beträgt 160 kDa bzw. 385 kDa als Dimer. Bei einer stillenden Mutter gelangt IgA in die Muttermilch und sorgt so auch für den Schutz des Kindes. Es dient zur Abwehr von Erregern an den Oberflächen der menschlichen Schleimhäute, z.B. in Nase, Rachen und Darm, und soll schon das Eindringen der Antigene in den Körper verhindern und diese neutralisieren. Dringen die pathogenen Erreger und Substanzen jedoch tiefer ein, kommt es zu einer Immunreaktion. IgA kommt sowohl als Monomer mit zwei leichten Ketten und zwei schweren  $\alpha$ -Ketten als auch als Dimer vor. Die Struktur eines sekretorischen IgA umfasst zwei IgA-Moleküle, die über eine J-Kette miteinander verbunden sind.

**Immunglobulin D (IgD)** ist das vorherrschende Immunglobulin auf der Oberfläche der B-Lymphozyten; seine genaue Funktion ist jedoch unbekannt. Das Molekulargewicht beträgt 172 kDa und die Halbwertszeit zwei bis drei Tage [64]. Es ist labil gegenüber Hitze und Proteolyse und im Serum nur in Spuren nachweisbar. Als membrangebundenes Immunglobulin ist es wichtig für die Reifung der B-Lymphozyten.

**Immunglobulin E (IgE)** ist in seiner Funktion stark spezialisiert und kommt im Blutserum nur in sehr geringen Mengen vor (0,3 mg/l) [64]. Sein Molekulargewicht beträgt 190 kDa. Vom Lymphgewebe in der Nähe der Atemwege und des Verdauungstraktes aus gelangt es ins Blut. Es spielt bei Allergien eine wichtige Rolle und ist vor allem in der Haut und den Schleimhäuten zu finden. Es hat, genau wie IgD, eine Halbwertszeit von zwei bis drei Tagen. Kommt es mit Allergenen in Kontakt, führt dies zur Ausschüttung von Stoffen (Mediatoren), die eine Entzündungsreaktion hervorrufen. In diesem Zusammenhang ist das Histamin der wohl bekannteste Mediator.

### **Gewinnung von monoklonalen, polyklonalen und rekombinanten Antikörpern**

*Monoklonale Antikörper* werden von einem B-Zell-Klon produziert, der auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgeht. Sie sind gegen genau ein spezifisches Epitop eines Antigens gerichtet und spielen in der medizinischen Diagnostik eine große Rolle, da sie mit hoher Spezifität Moleküle binden können. Die Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurde im Jahr 1975 von C. MILSTEIN, G. KÖHLER und N. JERNE veröffentlicht und 1984 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet [65]. Dazu werden Tiere immunisiert, um deren Plasmazellen zu gewinnen. Die Technik basiert auf der Verschmelzung von Antikörper-erzeugenden B-Lymphoblasten und Myelomazellen zu Hybridomazellen. Diese Zellen besitzen die Fähigkeit einer Plasmazelle, unbegrenzt einen spezifischen Antikörper zu produzieren und die Fähigkeit

## 2.5. Grundlagen der Immunoassays und ihre Methoden

einer Tumorzelle, sich unbegrenzt zu teilen, was sie unsterblich macht.

Die Vorteile der Benutzung monoklonaler Antikörper liegen zum Einen in der Möglichkeit, große Mengen an Antikörpern zeitlich unbegrenzt und in gleichbleibender Qualität und somit hoher Reproduzierbarkeit herstellen zu können. Zum Anderen minimiert die Monospezifität der Antikörper das Risiko von Kreuzreaktivitäten, im Gegensatz zu polyklonalen Antiseren, bei denen es häufiger zu unspezifischen Bindungen kommen kann [63]. Die Massenproduktion tausendender unterschiedlicher monoklonaler Antikörper wird mittlerweile von mehreren hundert Biotechnologie-Unternehmen realisiert [66]. Außerdem konnte die Qualität und Geschwindigkeit antikörperbasierender Diagnostik-Tests für viele Erkrankungen rapide erhöht werden [67]. Als Nachteil erweist sich die relativ aufwendige Herstellung.

Ein Tier, das mit einem Antigen immunisiert wird, produziert eine Mischpopulation von Antikörpern, die jeweils die gleiche Antigenspezifität besitzen, aber gegen unterschiedliche Epitope des Antigens gerichtet sind. Liegt diese Mischpopulation in aufgereinigter Form vor, wird sie als *polyklonaler Antikörper* bezeichnet; in nicht aufgereinigter Form wäre *polyklonales Antiserum* die korrekte Bezeichnung. Polyklonale Antikörper werden von unterschiedlichen B-Zell-Klonen erzeugt. Da sich eine physiologisch vorkommende Immunantwort stets gegen viele unterschiedliche Epitope des in den Organismus eindringenden Antigens richtet, ist diese immer polyklonal.

Vorteile von der Nutzung polyklonaler Antikörper sind die schnelle, meistens unkomplizierte und kostengünstige Herstellung einer relativ großen Serummenge. Das gewonnene polyklonale Antiserum ist sofort einsetzbar. Nicht erforderlich ist, wie bei monoklonalen Antikörpern, nach dem passenden Antikörper zu suchen. Es kann vorkommen, dass Klone ein Epitop des Antigens erkennen, das auch auf anderen Strukturen vorkommt, welches zu unerwünschten Kreuzreaktionen führen kann. Die Gesamtheit der polyklonalen Antikörper, deren Bindung an ein Antigen über mehrere unterschiedliche Epitope erfolgt, kann diese unspezifischen Bindungen jedoch kompensieren und insgesamt zu einer hohen Gesamtspezifität führen. Für den Nachweis kleiner Moleküle mit wenigen Epitopen eignen sich polyklonale Antikörper besonders gut. Je mehr Antikörper an die unterschiedlichen Epitope eines solchen Antigens binden, desto besser ist dieses zu erkennen.

Als Nachteil muss der manchmal geringe Anteil an gewünschten Antikörpern im Serum angeführt werden. Ein polyklonales Antiserum beinhaltet unabhängig von der Immunisierung eine Vielzahl von Antikörpern. Diese sind bereits vor der Immunisierung des Tieres vorhanden oder werden während der Immunisierung durch weitere unerwünschte Immunisierungen z.B. aufgrund von Infektionen produziert.

Bei polyklonalen Antikörpern stößt die Produktion nach einiger Zeit an ihre Grenzen. Dies kann durch den Tod des Tieres, eine Abnahme der Synthese oder einer mit der Zeit unzureichender werdenden Qualität des produzierten Antiserums bedingt sein. Sind immunogene Strukturen des Antigens, mit dem die Immunisierung angeregt wird, auch auf vielen anderen Antigenen vorhanden, kann es häufig zu Unspezifitäten kommen. Außerdem müssen die gewonnenen Antiseren ständigen Qualitätskontrollen unterliegen, da es zu Qualitätsschwankungen kommen kann.

Eine Alternative zu den klassischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern

## 2. Grundlagen

sind gentechnisch gewonnene Antikörperfragmente, die sogenannten *rekombinanten Antikörper*. Die Gewinnung findet vorwiegend über genetische Selektion aus Antikörperbibliotheken mit einer großen Vielfalt von Antikörpern statt [63]. U.a. durch die Einführung von Oligonukleotidsequenzen in die kodierten Bereiche der hypervariablen Regionen des Antikörpers können Antikörperbibliotheken synthetisch hergestellt werden. Diese Synthese kann in Bakterien, Hefen und Pflanzen erfolgen, erspart also den Einsatz von Tieren und ist zudem noch preisgünstig in der Kultivierung [68]. Weiterhin gibt es verschiedene Möglichkeiten, Antikörperfragmente gentechnisch herzustellen. Führt man eine Spaltung eines Immunglobulins mit Pepsin oder Papain durch, entledigt man sich des  $F_C$ -Teils und erhält ein bivalentes  $F_{(ab)_2}$ -Fragment bzw. ein monovalentes  $F_{ab}$ -Fragment (Abb.2.19 A).

Der kleinste rekombinante Antikörper, der sogenannte *fragment variable* (Fv), besteht nur aus einer variablen schweren Kette (VH) und einer variablen leichten Kette (VL), die über eine Peptidbrücke miteinander verbunden werden müssen, um einsetzbar zu sein. Dieser wird dann als *single chain fragment variable* (scFv)-Antikörper bezeichnet (Abb. 2.19 B).

Koppelt man zwei scFv miteinander, erhält man einen sogenannten *diabody* (Abb. 2.19 C). Außerdem können bispezifische Antikörper hergestellt werden, die zwei unterschiedliche Antigene gleichzeitig erkennen können. Dazu zählen z.B. bispezifische diabodies oder bispezifische  $F_{ab_2}$ -Fragmente (Abb.2.19 D). Rekombinante Antikörper können bzgl. ihrer Affinität, Antigene zu binden, ihrer molekularen Bauweise und Dimerisierung mit optimierten Eigenschaften entwickelt werden. Zusätzlich kann man sie mit einer Reihe von „Effektoreinheiten“ ausstatten, um ihre Fähigkeit der Zielrichtung auf Tumorzellen zu erhöhen [69].

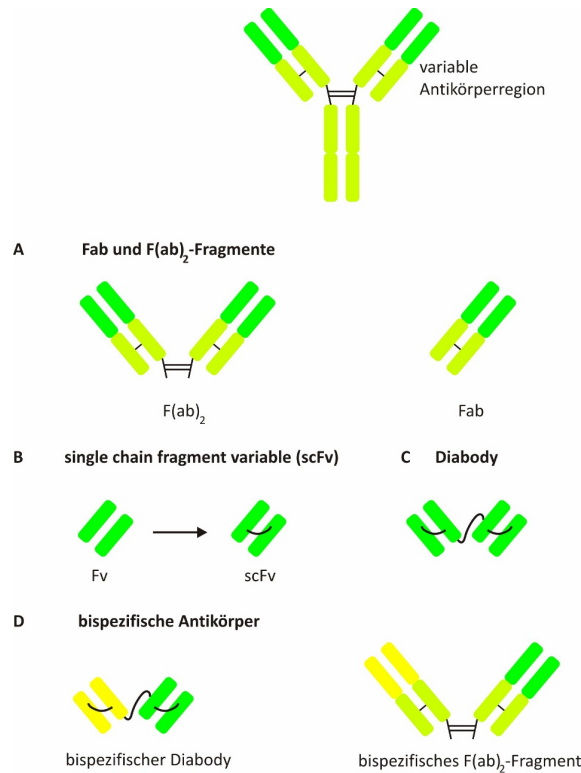
### 2.5.2. Das Antigen

Als Antigene bezeichnet man Stoffe, die eine spezifische Bindung mit Antikörpern und bestimmten Rezeptoren von Lymphozyten (B-Zell-Rezeptoren oder T-Zell-Rezeptoren) eingehen. Lösen Antigene eine Immunantwort aus, wirken sie *immunogen*. Die Antigenbindungsstelle wird als *Epitop* bezeichnet. Es handelt sich bei Antigenen meistens um Proteine oder Peptide, aber auch Kohlenhydrate und Lipide können zu den antigenen Stoffgruppen zählen. Um die Bildung von Antikörpern in einem Organismus anzuregen, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten: Es eignen sich sowohl natürliche aufgereinigte Antigene als auch synthetische Peptide, ganze Zellen oder Zellfragmente zur Immunisierung.

Eine Möglichkeit ist die Immunisierung mit aufgereinigten nativen Antigenen. Weist das Antigen Verunreinigungen und Modifikationen auf, kann besonders bei der Verwendung von polyklonalen Antikörpern die Zahl der unspezifischen Bindungen erhöht werden oder die Verunreinigungen sogar stärker immunogen sein als das Antigen selbst.

Auch rekombinante Antigene finden oft Anwendung, wobei hier auf die unterschiedliche „Antigenität“ von rekombinantem Antigen und nativem Antigen geach-

## 2.5. Grundlagen der Immunoassays und ihre Methoden



**Abbildung 2.19.:** Rekombinante Antikörper: Es gibt verschiedenen Möglichkeiten, Antikörperfragmente gentechnisch zu erzeugen: A) Durch Spaltung mit Pepsin oder Papain erhält man ein bivalentes  $F_{ab_2}$ -Fragment bzw. ein monovalentes  $F_{ab}$ -Fragment. B) *fragment variable* (Fv) besteht nur aus einer variablen schweren Kette (VH) und einer variablen leichten Kette (VL), die über eine Peptidbrücke miteinander verbunden sind. Dieser wird dann als *single chain fragment variable* (scFv)-Antikörper bezeichnet. C) Zwei scFv-Antikörper ergeben einen *diabody*. D) bispezifische Antikörper: bispezifische diabodies oder bispezifische  $F_{ab_2}$ -Fragmente (nach [30]).

tet werden muss. Für diese Art der Antikörperherstellung wird eine ausreichende Menge an natürlichem Antigen benötigt, zum Einen für die Immunisierung und zum Anderen für die Evaluierung des Antikörpers.

Eine Alternative bietet die Verwendung von synthetischen Peptiden, die auch problemlos in größeren Mengen mit Hilfe der Peptidsynthese produziert werden können. Die Schwierigkeit bei der Herstellung und Verwendung von synthetischen Peptiden ist die Generierung der Tertiärstruktur, also der übergeordneten räumlichen Struktur des Epitops, aus sehr kurzen Peptidsequenzen. Diese ist neben der Primärstruktur für das Gesamtprotein ausschlaggebend. Antikörper, die mit Hilfe solcher synthetischen Antigene erzeugt werden, haben oft Probleme, das native Epitop zu erkennen. Für viele Anwendungen führt diese Methode jedoch zum Erfolg.

Bei einer Immunisierung mit Haptenen (partielles oder unvollständiges Antigen)

## 2. Grundlagen

ergibt sich aufgrund ihrer Größe eine fehlende Immunogenität. Um sie zu „vergrößern“ und sie damit immunogen zu machen, werden sie an Carriermoleküle (z.B. Albumin, Polyaminosäure, Agarose) gekoppelt. Eine andere Möglichkeit ist die Immunisierung mit abgetöteten Zellen, Zellfragmenten, Bakterien oder Viren. Das Problem, das sich dabei ergibt, ist die Ermittlung des einen Antigens, welches der Antikörper erkennt, unter den vielen, die in einer Zelle vorhanden sind. Bei einer Immunisierung mit DNA sind keine Antigene erforderlich, da diese Methode direkt das Antigen-Gen nutzt. Dieses Vorgehen bietet sich besonders bei Anwendungen an, für die sich Antigene nicht mit ausreichender Qualität für eine Immunisierung rekombinant herstellen lassen.

### Die Antigen-Antikörper-Bindung

Bei den auftretenden Kräften zwischen Antikörper und Antigen handelt es sich um elektrostatische Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen. Kovalente Bindungen treten hierbei nicht auf. Die Kräfte bilden sich zwischen den Paratopen der Antikörper und den Epitopen der Antigene aus (siehe Abb. 2.20), wobei die variablen Domänen der Polypeptidketten der Antikörper die epitopspezifischen Paratope tragen, welche sich aufgrund ihrer Hypervariabilität dem entsprechenden Epitop des Antigens annähern und es entsprechend des *Schlüssel-Schloss-Prinzips* einschließen. Die meisten Antikörper haben planare Antigen-Bindungsstellen, die sich, im Gegensatz zu T-Zell-Rezeptoren, an Epitope von großen Makromolekülen und nativen globulären Proteinen anpassen können. Liegt eine monovalente Bindung zwischen Paratop und Epitop vor, also eine einzelne Antigen-Antikörper-Bindung, beschreibt die Affinität die Bindungsstärke. Dies ist der Fall, wenn ein Antikörper genau ein Antigen binden kann. Als Avidität eines Antikörpers bezeichnet man die Kraft einer multivalenten Bindung zwischen Antikörper und Antigen, die spezifisch oder multispezifisch (bei Reaktion des Antikörpers mit verschiedenen Antigen-Epitopen) sein kann. Die Avidität ist somit die Gesamtheit der Affinitäten. Anhand der Antigen-Konzentration, die benötigt wird, um 50 % der Bindungsstellen der in Lösung vorhandenen Antikörper-Moleküle in einem Equilibriumsgleichgewicht zu besetzen, wird die Bindungsstärke festgelegt. Bei einer einfachen 1:1 Interaktion ist die Equilibriumskonstante  $KD$  der Quotient aus der Dissoziationskonstante  $k_d$  und der Assoziationskonstante  $k_a$

$$KD = k_d/k_a.$$

Eine hohe Affinität führt zu einer niedrigen Konstante  $KD$ , da weniger Antigen-Moleküle benötigt werden, um die Bindungsstellen der Antikörper zu besetzen. Bei einer typischen Immunreaktion der Maus beträgt die  $KD$  der monoklonalen Antikörper, die produziert werden, zwischen  $10^{-7}$  mol/l und  $10^{-11}$  mol/l. Monoklonale Antikörper vom Kaninchen erreichen sogar  $KDs$  bis  $10^{-12}$  mol/l. Im Gegensatz dazu liegen die Werte der  $KDs$  von T-Zell-Rezeptoren lediglich zwischen  $10^{-5}$  mol/l und  $10^{-7}$  mol/l [30]. In der Praxis hat die Verwendung von hochaffinen Antikörpern



## 2.5. Grundlagen der Immunoassays und ihre Methoden

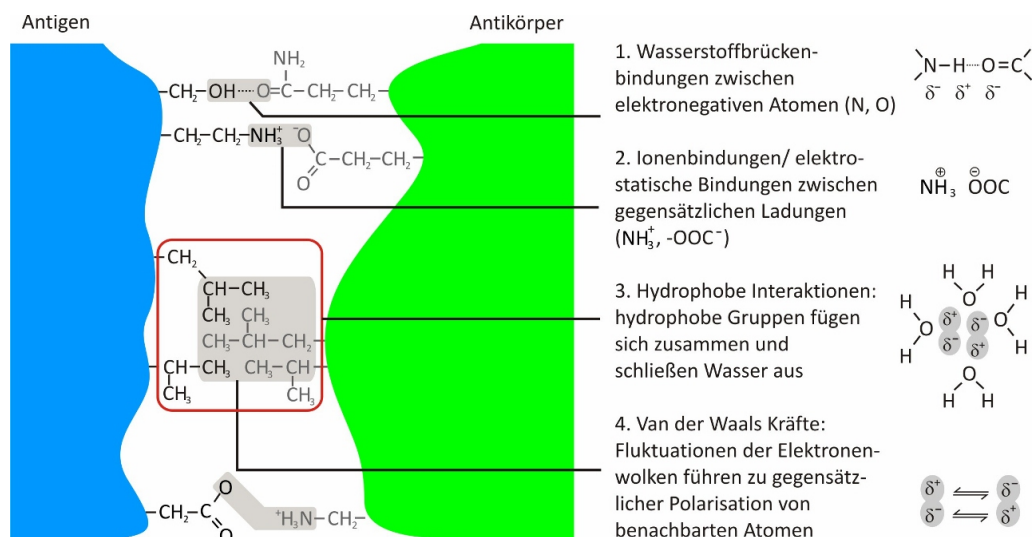


Abbildung 2.20.: Bindungskräfte zwischen Antikörper und Antigen (nach [30]).

den Vorteil, dass sie stärker an das Antigen binden, bei anfallenden Waschschritten nicht so schnell weggespült werden und außerdem Zeit und Geld sparen, da kürzere Inkubationszeiten und geringere Antikörper-Konzentrationen notwendig sind. Die Avidität, also die Gesamtbindungsstärke, ist aufgrund der Tatsache, dass alle Antikörper mindestens zwei Bindungsstellen haben, deutlich höher.

### 2.5.3. Häufig verwendete Immunoassays

#### ELISA

Das besondere Merkmal des ELISA (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*) ist die Kopplung von Analyt und markiertem spezifischen Antikörper an einen festen Träger. Im Allgemeinen handelt es sich dabei um eine Mikrotiterplatte mit Vertiefungen, deren Oberfläche Antikörper bzw. Analyt (je nach Methode) binden. Neben der qualitativen Aussage ist auch eine quantitative Aussage möglich. Dafür muss bei dem Nachweis der direkten Bindung von Analyt und Antikörper eine der beiden Komponenten in einer gereinigten und markierten Form vorliegen. Der Antikörper geht eine spezifische Bindung mit dem Analyten ein und genau dieser Komplex bleibt nach dem Waschen und Entfernen ungebundener Komponenten auf dem Träger gebunden. Dieser wird dann mittels einer enzymatischen Reaktion detektiert. Der Substratumsatz ist proportional zur Menge des gebundenen Analyten. Zu der Gruppe der quantitativen Festphasen-Immunoassays gehören neben dem ELISA mit enzymgekoppeltem Antikörper auch der Radio-Immunoassay (RIA, dessen Antikörper-Markierung ein Radioisotop ist), der Fluoreszenz-Immunoassay (FIA, dessen Antikörper-Markierung ein Fluoreszenzfarbstoff ist) und der Chemilumineszenz-Immunoassay (dessen Antikörper-Markierung ein luminogenes Molekül ist). Die Beliebtheit dieses Assays auf dem Gebiet der Diagnostik ist in der schnellen paral-

## 2. Grundlagen

lelen Analyse vieler Proben unter gleichen Bedingungen und geringen Volumina begründet. Die Detektionsgrenze liegt im günstigsten Fall bei  $10^{-12}$  mol/l (kann je nach Zielsetzung und Probenbedingungen variieren) [70].

Zur Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit des ELISA kann dieser mit der *Immuno-PCR* (IPCR) als Assay-Methode kombiniert werden. Anstelle des Antikörper-Enzym-Komplexes tritt hier ein Antikörper-DNA-Konjugat. Grundlage ist die Poly-merase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; PCR). Beim ELISA wird eine gegebene Menge eines Substrates in ein nachweisbares Produkt umgesetzt. Bei der IPCR werden die Produkte der DNA-Vervielfältigung in ca. 25-40 Zyklen kopiert. Die Signalsteigerung ist annähernd exponentiell und die Nachweisgrenze wird im Vergleich zum ELISA auf  $10^{-18}$  mol/l verbessert [70]. Im nachfolgenden Teilkapitel werden ELISA-Systeme noch eingehender betrachtet.

### Blot-Methoden

Bei den Blot-Methoden werden Substanzen auf eine Membran gebracht, auf der sie dann nachgewiesen werden können. Man unterscheidet zwischen Southern-Blot (Übertragung von DNA), Northern-Blot (Übertragung von RNA) und Western-Blot (Übertragung von Proteinen).

Zur Identifizierung von Proteinen eines Proteingemisches durch den Western-Blot werden die einzelnen Komponenten zunächst elektrophoretisch mittels SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) im Gel separiert und dann auf die Membran übertragen und fixiert. Daraufhin erfolgt eine Inkubation mit einem spezifisch an das antigene Epitop bindenden markierten Antikörper. Diese Bindung wird wie beim ELISA mittels Substratumsatz detektiert, weshalb man auch vom Immuno-Blot spricht. Eine Quantifizierung ist aufgrund von aufwendigen Messanlagen und relativ komplexer Durchführbarkeit schwierig. Einen schnellen Immunoassay, bei dem das Proteingemisch ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung auf die Membran übertragen wird, bezeichnet man als Dot-Blot, der das Gemisch auf das Vorliegen des gesuchten Analyten untersucht.

### Protein-Arrays

Um viele Proteine gleichzeitig zu erfassen und zu untersuchen, werden sogenannte Protein-Arrays oder Protein-Chips herangezogen, auf deren Oberfläche unterschiedliche Rezeptoren (bekannte Proteine oder Antikörper) auf Testfeldern, den sogenannten *Spots*, immobilisiert sind. Durch Inkubation mit der zu untersuchenden Probe können Vorkommen und Menge mehrerer Analyte gleichzeitig festgestellt werden. Findet eine Interaktion auf den Spots statt, wird diese detektiert. Findet keine Interaktion statt, bleibt der Spot nach einem Waschschrift leer. Man unterscheidet zwischen analytischen und funktionellen Microarrays. Beim analytischen Microarray werden komplexe Gemische qualitativ und quantitativ auf bestimmte Proteine getestet. Sie werden vor allem als Antikörper-Arrays in der Diagnostik

## 2.5. Grundlagen der Immunoassays und ihre Methoden

eingesetzt. Bei den funktionellen Arrays werden ganze Gruppen oder sogar das Proteom eines Organismus untersucht. Dafür werden sehr viele aufgereinigte Proteine in separaten Spots immobilisiert. Sie finden hauptsächlich Anwendung in der Grundlagenforschung und der Wirkstoff- und Targetidentifizierung.

### Oberflächenplasmonen-Resonanz

Die Oberflächenplasmonen-Resonanz (*surface plasmon resonance*; SPR) ist ein spektroskopisches Analyseverfahren und stellt eine schnelle und äußerst sensitive Methode dar, um Wechselwirkungen zwischen Molekülen ohne den Einsatz von Markierungsmolekülen qualitativ und quantitativ zu erfassen. Dabei werden die Schwingungen von freien Elektronen (Oberflächenplasmonen) an der Oberfläche von Metallfilmen ausgenutzt. Die Plasmonen werden durch Photonen angeregt, die wiederum an der Metalloberfläche reflektiert werden. Im Zuge der Entwicklung von DNA- und Protein-Chips gewinnt das SPR-Imaging als labelfreie flächenaufgelöste Detektionsmethode in der Bioanalytik immer mehr an Bedeutung. Dabei fungiert ein Chip als Sensor, auf dessen metallischer Oberfläche einer der Reaktionspartner gebunden ist. Die zu untersuchende flüssige Probe wird über den Chip geleitet. Geht ein Analyt aus der Probe eine Bindung mit dem am Chip gebundenen Molekül ein, ändert sich das Messsignal aufgrund der veränderten Schichtdicke bzw. des veränderten Brechungsindex. Anwendung findet die Methode vor allem in der Detektion von Biosensorchips bezüglich der Erkennung und Art von Bindungsvorgängen zwischen DNA und Proteinen mit einer Nachweisgrenze im Nano- bis Femtomolbereich.

### Zytometrie

Mit der Zytometrie werden Analyte nicht in Substanzgemischen, sondern direkt in oder auf den Zellen untersucht. Die Zellbestandteile können gleichzeitig mit Fluoreszenzmarkern versehen und so stöchiometrisch bestimmt werden.

Man unterscheidet zwischen zwei Analysesystemen: Dem Durchflusszytometer (*flow cytometer*, FCM) und dem objektträgerbasierten Zytometer (*slide based cytometer*, SBC). Bei der FCM werden die Zellen in Suspensionen gemessen (z. B. Blut oder andere Körperflüssigkeiten) und bei der SBC sind sie auf einer lichtdurchlässigen Oberfläche aus Glas oder Kunststoff immobilisiert (z. B. Gewebekulturen oder Gewebeschnitte). Die Fluoreszenzmarker werden mit Laserlicht oder einer Quecksilberdampflampe angeregt und das erzeugte Fluoreszenzlicht wird über Photomultiplier gemessen. Die Amplitude der Signale ist ein Maß für die Lichtstärke der fluoreszierenden Objekte. Es können alle Parameter oder Eigenschaften einer Zelle untersucht werden, die sich durch Fluoreszenzfarbstoffe erfassen lassen. Eines von vielen Anwendungsbeispielen ist die DNA-Zytometrie zur Frühdiagnose bösartiger Tumoren anhand von Messung des DNA-Gehaltes in den Tumorzellen. Die Anzahl der Chromosomen pro Zellkern ist in solchen Fällen gestört.

## 2. Grundlagen

### Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Wenn sich Analyte in Organen oder Zellkulturen befinden oder deren Interaktion mit anderen Zellen untersucht werden muss, stößt die Zytometrie an ihre Grenzen. Dann wird als mikroskopische Analysemethode die Immunhistochemie oder die Immunfluoreszenz genutzt. In histologischen Gewebeschnitten können Antigene anhand von markierten Antikörpern direkt nachgewiesen und z. B. Gensequenzen und Proteinexpressionen dargestellt werden. Um eine Signalverstärkung zu erzielen, werden jedoch oft indirekte Nachweise durchgeführt, bei denen zunächst ein spezifischer unmarkierter Antikörper an das nachzuweisende Antigen bindet und dann für dessen Nachweis ein enzymmarkierter Antikörper eingesetzt wird. Der entstehende Farbumschlag in unmittelbarer Nähe des gebundenen Komplexes kann lichtmikroskopisch untersucht werden. Im Unterschied zur Immunhistochemie, bei der Enzyme den Nachweis bringen, werden bei der Immunfluoreszenz verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe als Nachweismoleküle eingesetzt, die einen parallelen Nachweis mehrerer Analyte erlauben und mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

### DNA-Microarrays

DNA-Microarrays werden für simultane Messungen der mRNA-Moleküle des menschlichen Genoms eingesetzt. Sie enthalten spezifische Sonden für jedes einzelne Gen. Die Moleküle werden in cRNA umgeschrieben, mit Digoxigenin markiert und auf dem Microarray hybridisiert. Sind in der Probe zu den Gensonden komplementäre cDNAs vorhanden, gehen sie Wasserstoffbrückenbindungen mit den entsprechenden Basen ein. Daraufhin bindet ein Konjugat aus einem Anti-Digoxigenin-Antikörper und alkalischer Phosphatase an das Digoxigenin. Anschließend wird das mittels einer Reaktion an der alkalischen Phosphatase erzeugte Licht mit einer im Messgerät enthaltenen CCD-Kamera detektiert.

#### 2.5.4. ELISA-Systeme

Aufgrund der Vielzahl der vorhandenen Immunoassays mit ihren unterschiedlichen Anwendungsgebieten ist es relativ komplex, einen neu entwickelten Immunoassay in der  $\mu$ FFE, wie er in dieser Arbeit vorgestellt wird, in dieses breite Gebiet einzuordnen und Vergleiche anzustellen. ELISA-Systeme haben sich schon lange Zeit in vielen Bereichen als sehr sensitive analytische Verfahren etabliert. Sie finden ihre Einsatzgebiete sowohl in der klinischen Diagnostik als auch der Lebensmittel-, Umwelt- und pharmazeutischen Analytik. Bei einem hohen Probenumsatz sind sie vergleichsweise unkompliziert und preisgünstig durchzuführen. Aus diesen Gründen beschäftigt sich dieses Kapitel etwas eingehender mit der Funktionsweise und Durchführung eines ELISA, um dann den in dieser Arbeit entwickelten Immunoassay gegenüberstellend beurteilen zu können.

Die Antigen-Antikörper-Reaktion bildet die Grundlage für viele diagnostische Verfahren. Den Startschuss für die Bindung von Immunglobulinen an Kunststoffober-

## 2.5. Grundlagen der Immunoassays und ihre Methoden

flächen, den sogenannten Festphasen-Immunoassays, gaben im Jahr 1967 CATT und TREGGAR mit einem Radioimmunoassay (RIA) [71]. Im Jahr 1971 waren es dann unabhängig voneinander ENGVAL und PERLMAN sowie VAN WEEMEN und SCHUURS, die erstmals über Festphasen-Enzymimmunoassays berichteten [72, 73]. Der ELISA, der auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert, hat sich seit dieser Zeit rasant weiterentwickelt und insbesondere in der medizinischen Diagnostik etabliert. Die Standard-Festphase ist sowohl bei kleinerem Probendurchsatz in Forschungslaboren als auch bei industriellen Hochdurchsatztests (engl. *high throughput screening*; HTS) eine spezielle Mikrotiterplatte mit 96 Wells, eine transparente Platte aus Polystyrol mit einem Fassungsvermögen von 300  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung (Well). Mit der mittlerweile verfügbaren Fülle von unterschiedlichen Antikörpern hat sich auch die Vielfalt der möglichen Formate der ELISAs gesteigert. Weiterhin vereinfachen die kommerziell erhältlichen Vernetzungsreagenzien (*crosslinker*) die Anwendung von Antigen-Antikörper-Komplexen gekoppelt mit Enzymen. Der FIA (*fluorescence immuno assay*) profitiert von der Vielzahl der heute verfügbaren Fluoreszenzfarbstoffen, die aufgrund ihrer spezifischen reaktiven Gruppen problemlos an Antikörper oder Antigene gekoppelt werden können.

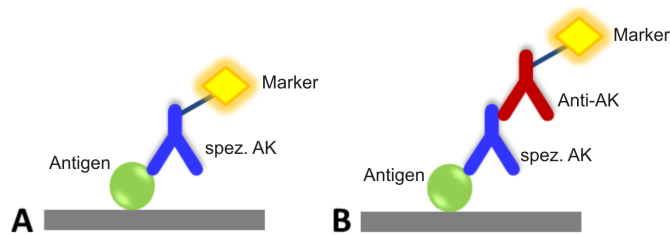
Der ELISA dient u.a. dem Nachweis von Proteinen, Viren, Antikörpern, Hormonen, Toxinen oder Pestiziden. Grundlegend hierfür sind spezifische Antikörper, die an das nachzuweisende Antigen binden. Die entsprechenden Antikörper werden zuvor mit einem Markermolekül, im Fall des ELISA mit einem Enzym, markiert. Dieses erzeugt nach Zugabe eines Substrates einen Farbumschlag, welcher quantifiziert und detektiert werden kann. Obgleich viele unterschiedliche Assaytypen entwickelt wurden, haben sie einige grundlegende Gemeinsamkeiten.

### Direkte und indirekte Assays

Zunächst kann man eine Einteilung in *direkte* und *indirekte* Assays vornehmen [74]. Der direkte Assay zeichnet sich dadurch aus, dass der spezifische Antikörper (Primärantikörper) das Markermolekül trägt (Abb. 2.21 A). Beim indirekten Assay ist ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper mit einem Markermolekül versehen (Abb. 2.21 B). Beide Methoden haben Vor- und Nachteile. Der Vorteil des direkten Assays liegt in der Reduzierung der Inkubationsschritte, wodurch das Auftreten von unspezifischen Bindungen aufgrund von z.B. Protein-Protein-Wechselwirkungen verringert wird.

Der indirekte Assay ermöglicht es, dass mehrere markierte Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden können und so eine Signalverstärkung verursachen. Zudem wird die Anwendung indirekter Assays durch eine große Auswahl kommerziell erhältlicher markierter Sekundärantikörper vereinfacht. Ein weiterer Vorteil ist darin zu sehen, für verschiedene Assays, bei denen spezifische Antikörper einer Spezies genutzt werden, denselben markierten Sekundärantikörper zu verwenden. Im Gegensatz zum direkten Assay mit nur einem antigenspezifischen Antikörper muss das Markermolekül nur an einen Antikörpertyp gekoppelt werden, der gegen un-

## 2. Grundlagen



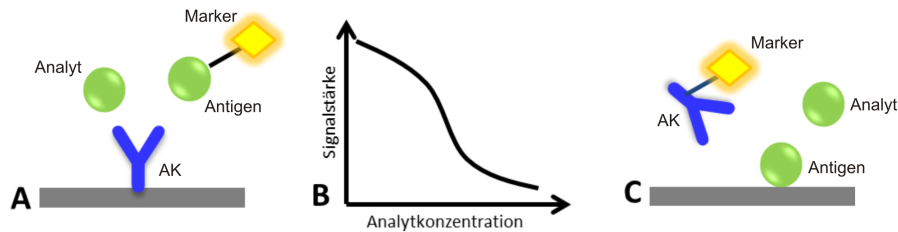
**Abbildung 2.21.:** Direkter und indirekter Assay. Beim direkten Assay wird der spezifische Antikörper mit einem Markermolekül gekoppelt (A). Beim indirekten Assay wird ein markierter Anti-Antikörper verwendet, der gegen den spezifischen Antikörper gerichtet ist (B).

verschiedene Antigene gerichtet ist und demnach auch für unterschiedliche Assays einsetzbar ist.

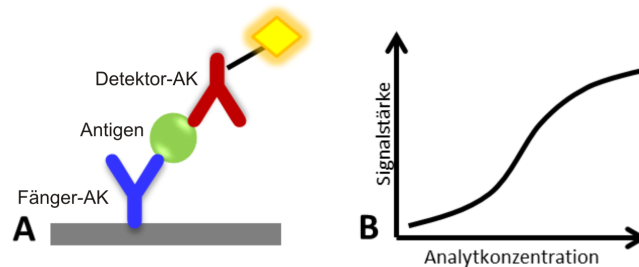
### Kompetitive und nichtkompetitive Assays

Weiterhin wird eine Abstufung in *kompetitive* und *nichtkompetitive* Assays vorgenommen (siehe Abb. 2.22) [75]. Beim kompetitiven Assay konkurriert der Analyt aus der zu messenden Probe mit einem markierten Antigen. Im Falle eines ELISA ist es ein Enzym, welches dem Assay in bestimmten Konzentrationen zugegeben wird (siehe Abb. 2.22 A). Der spezifische Antikörper ist dabei an die Festphase gebunden. Das markierte Antigen wird jeder Probe in gleicher Konzentration zugeführt. Der Analyt, dessen Konzentration man bestimmen möchte, und das markierte Antigen stehen nun in Konkurrenz bezüglich der Bindung an den spezifischen Antikörper. Ist kein Analyt in der Probe vorhanden, resultiert dies in einem hohen Signal, da alle markierten Antigene an die Antikörper binden. Je höher die Konzentration des Analyt in der Probe ist, desto geringer wird das Signal, da zwischen der Bindung und der Konzentration an markiertem Antigen und Analyt ein proportionaler Zusammenhang besteht. Trägt man in der Dosis-Wirkungs-Kurve (Abb. 2.22 B) die Signalstärke gegen die Analytkonzentration auf, ergibt sich ein umgekehrt proportionaler Verlauf. Ein alternativer Aufbau des kompetitiven Assays ist in Abbildung 2.22 C zu sehen. Hier ist der spezifische Antikörper mit einem Markermolekül versehen und das Antigen ist an die Festphase gebunden. Es konkurrieren nun Antigen und Analyt um die Bindung an den spezifischen markierten Antikörper. Auch hier erhält man einen umgekehrt proportionalen Signalverlauf. Beim nichtkompetitiven Assay ist die Signalstärke direkt proportional zur Analytkonzentration. Der bekannteste Vertreter ist der Sandwich-Assay (siehe Abb. 2.23 A). Dabei ist das Antigen zwischen zwei spezifischen Antikörpern gebunden, von denen der sogenannte „Fänger-Antikörper“ an der Festphase immobilisiert ist und der sogenannte „Detektor-Antikörper“ das

## 2.5. Grundlagen der Immunoassays und ihre Methoden



**Abbildung 2.22.:** Kompetitiver Assay. Analyt und markiertes Antigen konkurrieren um die Bindung an den spezifischen Antikörper (A). Die Dosis-Wirkungskurve zeigt einen umgekehrt proportionalen Verlauf von Signal und Analytkonzentration (B). Beim alternativen Aufbau eines kompetitiven Assays ist das Antigen auf der Festphase immobilisiert und steht in Konkurrenz mit dem Analyt um den markierten spezifischen Antikörper (C).



**Abbildung 2.23.:** Sandwichassay (A). Der Fänger-Antikörper ist auf der Festphase immobilisiert. Das Antigen bindet an diesen und über den Detektor-Antikörper wird der Komplex detektiert. Die zugehörige Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt die direkte Proportionalität des Signals zur Analytkonzentration (B).

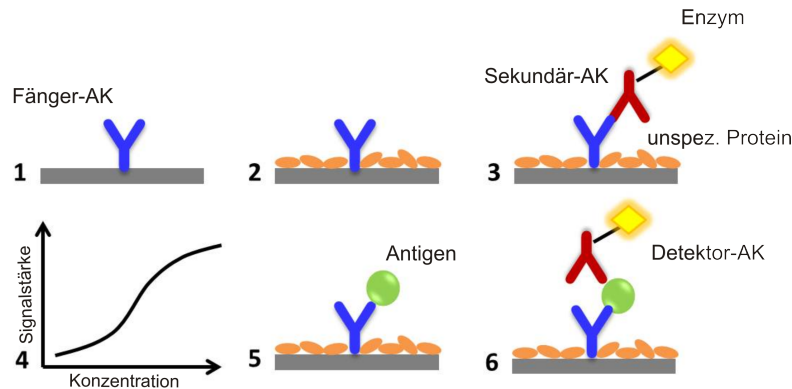
Markermolekül (im Fall des ELISA ein Enzym) trägt. Diese Methode ist jedoch nur anwendbar, wenn das Antigen zwei unterschiedliche Epitope aufweist, die gleichzeitig von zwei Antikörpern gebunden werden können. Es muss also für die Bindung von zwei Antikörpern groß genug sein. Je mehr Antigen in der Probe vorhanden ist, desto höher ist auch das Messsignal, was in Abb. 2.23 B dargestellt wird.

### Durchführung eines ELISA

Die Auswahl der geeigneten Mikrotiterplatte für den ELISA hängt von den Anforderungen an den Assay ab. Gebräuchlich sind Polystyrolplatten mit 96 Wells in unterschiedlichen Ausführungen bzgl. der Bindungseigenschaften für Proteine und

## 2. Grundlagen

der Form des Bodens der Wells. Grundsätzlich ist darauf zu achten, dass es zu keinen Temperaturschwankungen während der Inkubation kommt, da sich über die ELISA-Platte ein Temperaturgradient entwickeln kann, der zu unterschiedlichen Bindungsreaktionen in den Wells führt [74].



**Abbildung 2.24.:** Abfolge der Optimierungsschritte beim Sandwich-ELISA. 1) Beschichtung der ELISA-Platte mit Fänger-Antikörpern, 2) Absättigung der Platte mit unspezifischem Protein, 3) Bestimmung der optimalen Beschichtungskonzentration durch Nachweis mit enzymmarkiertem Sekundär-Antikörper, 4) Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve, 5) Inkubation mit Antigen, 6) Antigen-Nachweis mit enzymmarkiertem Detektor-Antikörper.

Will man z.B. einen Sandwich-Assay durchführen, besteht der erste Schritt in der **Beschichtung der ELISA-Platte** mit dem Fänger-Antikörpern mit entsprechend optimierter Konzentration und optimiertem pH-Wert der Beschichtungslösung (siehe Abb. 2.24.1). Die am besten geeignete Beziehung von Konzentration und pH-Wert wird anhand einer Verdünnungsreihe des Antikörpers von  $10 \mu\text{g/ml}$  bis  $0,1 \mu\text{g/ml}$  in drei unterschiedlichen Puffersystemen in mehreren Wells ermittelt [74]. Man verwendet Carbonatpuffer (pH 9,6), Phosphatpuffer (pH 7,4) und Acetatpuffer (pH 5,5). Zusätzlich wird in einige Wells der Puffer ohne Antikörper gefüllt, um eine Referenz zu erhalten. Eine Bindung erfolgt nach wenigen Stunden. Es wird aber trotzdem über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  beschichtet, da sich bei längerer Inkubationszeit stabilere Verankerungen ausbilden.

Durch mehrmaliges Ausschlagen der Platten und dreimaliges Spülen der Wells mit Waschpuffer aus phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) oder Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) werden überschüssige oder zu schwach gebundene Antikörper beseitigt, die bei weiteren Inkubationsschritten gelöst und zu falschen Messwerten führen würden. Um ein evtl. auftretendes Hintergrundsignal zu minimieren, bietet sich bei einigen Assays die Zugabe von  $0,05\%$  Tween 20 an.



## 2.5. Grundlagen der Immunoassays und ihre Methoden

Im zweiten Schritt folgt die **Blockierung der Oberfläche** für eine Stunde bei Raumtemperatur. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass nach dem Beschichtungsvorgang einige Bereiche der Polystyrol-Platte noch weitere Proteine binden können, die später evtl. enzymmarkierte Antikörper unspezifisch binden und so zu einer Erhöhung des Hintergrundsignals führen. Um dieses Problem zu minimieren, werden diese Bereiche mit einem unspezifischen Protein beschichtet, das mit keiner der im Assay genutzten Bestandteile bindet (siehe Abb. 2.24.2). Als Blockierungsvolumen werden 200  $\mu\text{l}$  pro Well genutzt (im Gegensatz zu 100  $\mu\text{l}$  pro Well beim Beschichtungsvolumen). So ist auch der Bereich oberhalb des Assayvolumens geblockt, was unspezifische Bindungen bei Schwankungen im späteren Füllvolumen der Wells vorbeugt. Auch bei den zuvor nur mit Pufferlösung behandelten Wells wird auf diese Weise vorgegangen.

Um zu überprüfen, welche der anfangs gewählten Einstellungen an Antikörperkonzentration am besten geeignet ist, wird der an der Oberfläche gebundene Antikörper mit Hilfe eines gegen ihn gerichteten enzymmarkierten Sekundär-Antikörpers detektiert (siehe Abb. 2.24.3). Dies geschieht auch wieder in den Referenz-Wells, um auftretende unspezifische Bindungen festzustellen. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte dreimal mit Waschpuffer behandelt und mehrmals ausgeschlagen.

Als anschließender Arbeitsschritt folgt die **Detektion mittels Farbreaktion**. Abhängig vom verwendeten Enzymmarker wird das entsprechende Substrat hinzugegeben, das die Farbreaktion hervorruft. Im Fall von Meerrettich-Peroxidase verwendet man oft Tetramethylbenzidin, das sich in einer Blaufärbung bemerkbar macht. Durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure findet ein Farbumschlag zu gelb statt, deren optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen wird. Dadurch wird der Test auch gleichzeitig gestoppt, da Schwefelsäure die Peroxidase inaktiviert. Die OD-Werte trägt man nun gegen die verschiedenen Antikörper-Konzentrationen auf und erhält mit Hilfe dieser Optimierungskurven einen Konzentrationswert, der der Antikörperkonzentration entspricht, die maximal an die Platte gebunden wird (siehe Abb. 2.24.4). Dieser kann für die verschiedenen pH-Werte große Unterschiede aufweisen.

Beim nächsten Schritt wird zur **Bestimmung der Funktionalität des Fänger-Antikörpers** eine Platte mit der optimalen Fänger-Antikörperkonzentration bei den drei verschiedenen pH-Werten beschichtet und, wie zuvor beschrieben, blockiert. Beim Sandwich-Assay wird nun eine Verdünnungsreihe über zwei bis drei Größenordnungen des Antigens benötigt. Die in verschiedenen Pufferlösungen an die Festphase gebundenen Fänger-Antikörper werden jetzt mit der Verdünnungsreihe der Antigenlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, wobei auch hier einige Wells als Referenz ohne Antigen genutzt werden (siehe Abb. 2.24.5).

## 2. Grundlagen

Nach den sich erneut anschließenden Waschschritten und dem Ausschlagen der Platte folgt die **Inkubation mit dem Detektor-Antikörper** (siehe Abb. 2.24.6), mit dem das Antigen nachgewiesen wird. Man erhält unterschiedliche Sättigungskurven abhängig von Antigenkonzentration und pH-Wert. Die Kurve, bei der die Steigung am größten ist, weist auf die größte Empfindlichkeit des Assays und damit den optimalen pH-Wert hin. Schon kleine Unterschiede in der Antigenkonzentration bedeuten große Unterschiede in der OD. Wenn also mit steigender Antigenkonzentration keine Zunahme der OD einhergeht, hat der Antikörper aufgrund der Immobilisierung seine Bindungsfähigkeit verloren. Das bedeutet, dass der Detektorantikörper über einen Anti-Antikörper oder einen Avidin-Biotin-Komplex gebunden werden muss.

Unter den so gefundenen optimalen Bedingungen wird nun eine ELISA-Platte mit Fänger-Antikörper beschichtet und mit verschiedenen konzentrierten Antigen-Standards inkubiert. Jede Konzentration wird für eine Mittelwertbestimmung in mehrere Wells pipettiert. Damit kann der Konzentrationsbereich der Standardkurve genau bestimmt werden. Anhand der Standardkurve kann man Aussagen darüber treffen, ob ein Assay funktioniert hat und auf diese Weise den Messbereich festlegen. Nur im linearen Bereich der Standardkurve lassen sich Konzentrationen mit genügend hoher Genauigkeit bestimmen [74]. Wurde der lineare Bereich der Standardkurve festgelegt, kann man zur Optimierung der Inkubationszeiten pro Schritt übergehen, um die Zeit für eine Assay-Durchführung zu verkürzen. Dabei wird jeweils ein Inkubationsschritt variiert, während die anderen gleich bleiben.

Um einen kompetitiven Assay zu optimieren wird ähnlich verfahren. Die Funktionalität des Fänger-Antikörpers erfolgt über das enzymmarkierte Antigen. Die maximal bindende Antigen-Konzentration wird anhand einer Konzentrationsreihe ermittelt. Beim kompetitiven Assay ist es von großer Wichtigkeit, dass das enzymmarkierte Antigen nicht im Überschuss vorliegt, weil der Analyt aus der zu untersuchenden Probe gegen das enzymmarkierte Antigen um die Bindung an den Fänger-Antikörper konkurriert und dieses verdrängen soll. Es muss also als optimale Konzentration ein Wert knapp unterhalb der maximal bindenden Konzentration gewählt werden. Zusätzlich optimiert man weiterhin dahingehend, den größten Messbereich zu erhalten und die geringste Analytkonzentration nachweisen zu können.

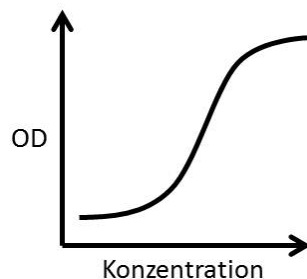
Je nach Wunsch kann die **Auswertung** eines ELISA qualitativ oder quantitativ erfolgen.

Der **qualitative Assay** trifft lediglich Aussagen darüber, ob eine Probe Analyt bzw. Antikörper enthält, nicht aber mit welcher Konzentration der jeweilige Stoff vorliegt. Dazu muss ein Schwellenwert bestimmt werden. Dies ist oft der Mittelwert einer Mehrfachbestimmung des Leerwertes zuzüglich des Dreifachen der Standardabweichung mit dem alle darüber liegenden Werte als „positiv“ und alle darunter liegenden Werte als „negativ“ definiert werden. Bei manchen Assays bietet sich an, alle Werte, die mindestens 0,1 OD größer sind als der Leerwert als „positiv“ anzusehen.

Der **quantitative Assay** trifft Aussagen darüber, in welcher Konzentration ein

## 2.5. Grundlagen der Immunoassays und ihre Methoden

Analyt bzw. Antikörper in der zu untersuchenden Probe vorliegt. Zunächst werden Proben mit bekannten Analytkonzentrationen unter gleichen Bedingungen wie die unbekanntenen Proben inkubiert, wobei aufgrund der nie hundertprozentig identischen äußeren Bedingungen auf jeder Platte eine Standardkurve mit aufgenommen wird.



**Abbildung 2.25.:** Standardkurve eines Sandwich-ELISA.

Eine zunächst erstellte Standardkurve, die unter Optimalbedingungen gemessen wurde, dient der Bestimmung der Konzentrationen in den zu untersuchenden Proben. Bei Auftragung der OD gegen die Konzentration der Proben erhält man einen sigmoiden Kurvenverlauf (siehe Abb. 2.25). Nach einer anfänglich schwachen Steigung geht die Kurve in einen linearen Bereich über. Dieser liefert die beste Reproduzierbarkeit des Verhältnisses der OD zur Konzentration. Es folgt ein Plateau. Anhand des häufig verwendeten Vier-Parameter-Plots kann eine Kurve an die Messpunkte angepasst und so die Auswertung vollzogen werden.

Bezüglich des Aufbaus und der Anwendung gibt es für den ELISA unterschiedliche Möglichkeiten. Die Entwicklung, Optimierung und Validierung kann unter Umständen sehr kompliziert sein. Um brauchbare Ergebnisse liefern zu können, müssen Antikörper, Konjugate und Puffersysteme genau aufeinander abgestimmt sein.

### 2.5.5. Fluoreszenz-Immunoassay

Bei dem sogenannten Fluoreszenz-Immunoassay (FIA) werden Fluoreszenzfarbstoffe als Markierung an die Antikörper gekoppelt, die die Voraussetzung einer direkten Detektion der Bindung von Antikörper und Antigen schaffen. Bei Anregung des Fluorophors mit Licht der für ihn spezifischen Anregungswellenlänge emittiert dieser Licht eines bestimmten für ihn spezifischen Wellenlängenbereichs, das durch den Einsatz entsprechender Filter und Detektoren detektiert werden kann. Im Unterschied zum FIA verstärkt sich beim ELISA das Messsignal mit der Zeit. Auf die grundlegenden Eigenschaften der Assaytypen haben die unterschiedlichen Marker keinen Einfluss.

Fluoreszenzimmunoassays finden ein breites Anwendungsgebiet und bieten hohe Sensitivität in der Proteindetektion [70, 76]. Der Fluoreszenznachweis wird u. a. bei

## 2. Grundlagen

der Immuno-PCR und bei Assayformaten verwendet, die sich *Quantum dots* (lumineszierende nanokristalline Halbleiter) zu Nutze machen. Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei  $10^{-15}$  mol/l (Quantum dots) und  $10^{-18}$  mol/l (Immuno-PCR) [70]. Andere Festphasen-Fluoreszenz-Immunoassays nutzen den SERS-Effekt (engl. *surface-enhanced raman spectroscopy*) aus und erreichen auf einer Goldoberfläche Sensitivitäten von  $10^{-15}$  mol/l [77]. Eine andere Möglichkeit bieten labelfreie Fluoreszenz-Immunoassays mit Ochratoxin A, die eine Empfindlichkeit von  $10^{-9}$  mol/l erreichen [78].

## 3. Methoden und experimenteller Aufbau

Als Detektionsverfahren für die isoelektrische Fokussierung in der miniaturisierten Frei-Fluss-Elektrophorese wird in dieser Arbeit die Methode der *laserinduzierte Fluoreszenz* (LIF) eingesetzt, jedoch werden anstatt des Lasers unterschiedliche LEDs (engl. *light-emitting diodes*) verwendet. Im Wellenlängenbereich der anzuregenden Fluoreszenzlabel erfolgt die Detektion der Proben mit einer EMCCD (engl. *electron multiplying charged coupled device*)-Kamera. Der Einsatz von LEDs ermöglicht aufgrund der Emission in einem begrenzten Spektralbereich die Anregung der fluoreszenzmarkierten Moleküle über ihren gesamten Anregungsbereich. Im Vergleich zu einem Laser sind LEDs in Anschaffung und Betrieb bei vergleichbarer Leistung erheblich günstiger.

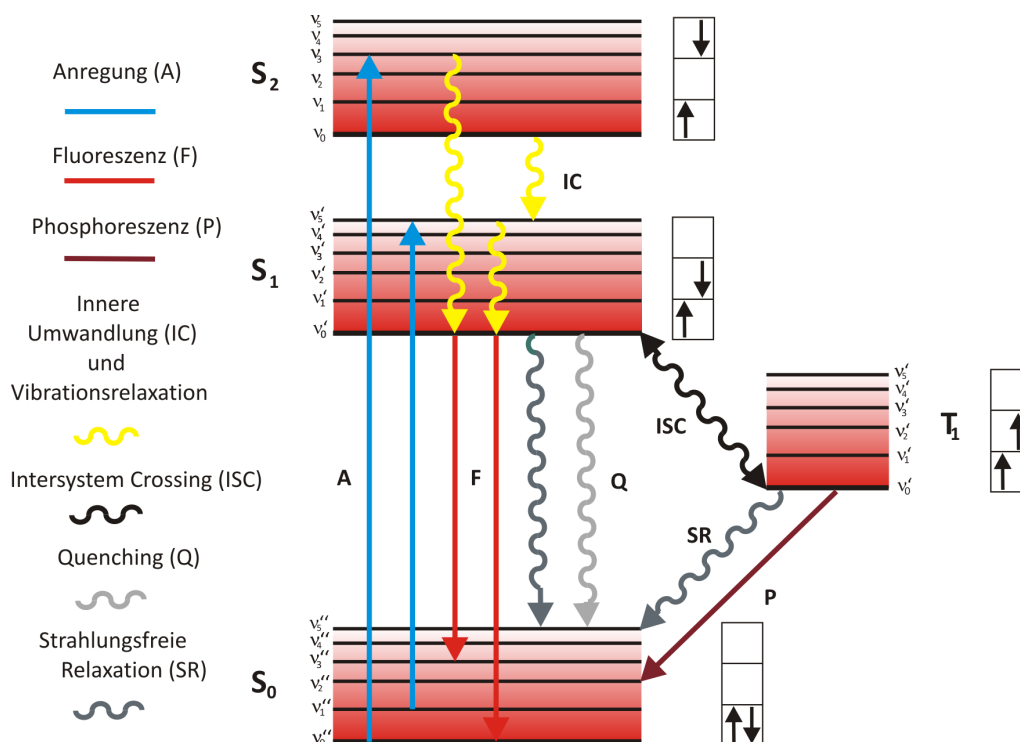
### 3.1. Grundlagen der Fluoreszenz

Der Vorteil der Fluoreszenzdetektion als Nachweisverfahren liegt in der hohen Sensitivität dieser Methode. Sie findet Anwendung sowohl in Bereichen nativer Fluoreszenz als auch der indirekten Fluoreszenz über Fluoreszenzlabel.

Wird ein Molekül mit Licht bestrahlt, findet unter bestimmten Bedingungen durch Absorption von Photonen ein Übergang der Valenzelektronen der Atome des Moleküls vom Grundzustand in ein energetisch höheres Niveau statt. Die Energie des absorbierten Photons  $E = h\nu$  muss dafür der Energiedifferenz von Grundzustand  $E_0$  und angeregtem Zustand  $E_1$  entsprechen:  $h\nu = E_1 - E_0$ . Der Übergang zurück in den Grundzustand findet unter spontaner Emission eines Photons statt und wird als *Fluoreszenz* bezeichnet. Sie ist neben der *Phosphoreszenz* eine Form der *Lumineszenz*. Die Lichtemission, die bei der Fluoreszenzstrahlung entsteht, beruht auf Singulett-Singulett-Übergängen vom ersten angeregten Zustand  $S_1$  in den Grundzustand  $S_0$ , woraus sich eine weitere Bedingung ergibt. Die Fluoreszenzübergänge gehorchen der Auswahlregel  $\Delta S = 0$ , d.h. sie erfolgen zwischen Zuständen gleichen Spins. Das angeregte Elektron hat einen entgegengesetzten Spin zum Bindungspartner im Grundzustand, die Spins der bindenden Elektronen sind also antiparallel. Für das Gesamtspinmoment gilt  $S = 0$ . Koppelt der resultierende Elektronenspin nicht zu Null, sondern zu 1, liegt ein Triplettzustand  $T$  vor. Entsprechend der Energieniveaus werden diese mit  $T_0, T_1, T_2, \dots$  bezeichnet. Neben der Fluoreszenz existieren noch andere Relaxationsprozesse, d.h. Vorgänge, die ein Teilchen unter Energieabgabe von einem angeregten Zustand in den Grundzustand überführen: *Vibrati-*

### 3. Methoden und experimenteller Aufbau

*onsrelaxation, Internal Conversion, Intersystem Crossing* und *Phosphoreszenz*. Im Jablonski-Diagramm sind diese Vorgänge zusammengefasst. Es zeigt die Energien der Elektronenübergänge, die bei Absorption und Emission von Photonen auftreten.



**Abbildung 3.1.:** Jablonski-Diagramm. Die verschiedenen quantenmechanischen Prozesse können hier zusammengefasst werden. Fluoreszenz F und Phosphoreszenz P sind Vorgänge, bei denen Strahlung frei wird. Strahlungsfreie Prozesse sind neben Quenching Q, Innere Umwandlung IC und Intersystem Crossing ISC. Der jeweils rechte Pfeil zeigt die Spinrichtung des angeregten Elektrons an. Singulett- und Triplettzustände werden mit S bzw. T bezeichnet.

Fluorochrome treten meistens als aromatische Ringstrukturen auf, die delokalisierte Elektronen in bindenden p-Orbitalen aufweisen. Dort liegen sie mit antiparallem Spin vor. Diese Eigenschaft charakterisiert die Singulett-Zustände  $S_0, S_1, S_2$ . Die Elektronen in den bindenden p-Orbitalen treten leicht in Wechselwirkung mit ihrer Umgebung und gehen bei Absorption eines Anregungsphotons in ein höheres Orbital  $p^*$  über. Der Übergang eines Elektrons aus dem Grundzustand  $S_0$  in einen der angeregten Zustände  $S_1$  oder  $S_2$  erfolgt sehr schnell in ca.  $10^{-15}$ s [79]. Bei der *Vibrationsrelaxation* verweilt das Molekül  $10^{-10}$ s in einem angeregten Zustand, bevor es ein Photon emittiert [80]. In dieser Zeit kann, abhängig von der Umgebung des Moleküls, auch Energie in anderer Form abgegeben werden. In Flüssigkeiten kann eine Abgabe der überschüssigen Schwingungsenergie innerhalb von  $10^{-13}$ s bis  $10^{-11}$ s in Form von Stößen an benachbarte Teilchen stattfinden. Das Teilchen wird in den

### 3.1. Grundlagen der Fluoreszenz

Schwingungsgrundzustand überführt, ohne dass ein Photon emittiert wird und ohne dass eine Änderung der Elektronenstruktur hervorgerufen wird. Beim Übergang von einem elektronisch angeregten Zustand in einen niederenergetischen Zustand oder den Grundzustand ohne Emission eines Photons und ohne eine Spinumkehr, spricht man von *Innerer Umwandlung* (*Internal Conversion IC*).

Der Übergang nach  $S_0$ , bei dem ein Photon emittiert wird, wird als *Fluoreszenz* bezeichnet. Da die Energie des emittierten Photons immer geringer ist als die des absorbierten Photons (in der Regel 15 nm – 25 nm), ist nach der Stokes'schen Regel die Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes größer als die des Anregungslichtes (*stokes shift*). Bei Fluorochromen liegt die mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer im Bereich von 10 ns. Bei manchen Verbindungen kommt es auch zu einem strahlungslosen Übergang von einem angeregten Singulett- zu einem Triplett-Zustand ( $S_1 \rightarrow T_1$ ) mit einhergehender Änderung der Multiplizität. Diesen Vorgang bezeichnet man als *Intersystem Crossing* (*Interkombination*). Das Elektron wechselt unter Spinumkehr in den metastabilen Triplettzustand, wobei die Übergangswahrscheinlichkeit hierfür geringer ist als bei Fluoreszenzübergängen zwischen zwei Singulett-Zuständen, auch die Emissionsraten sind sehr gering. Die Dauer eines solchen Übergangs liegt zwischen  $10^{-8}$ s bis  $10^{-5}$ s [80]. Innerhalb des Triplett-Zustandes kann wieder eine Umkehr in den Grundzustand stattfinden. Der Übergang in den Singulett-Zustand ist nur bei erneuter Spinumkehr möglich. Findet ausgehend vom Triplett-Zustand ein Übergang in den Grundzustand  $S_0$  unter Emission eines Photons statt, spricht man von *Phosphoreszenz*. Im Unterschied zur Fluoreszenz ändert sich hier die Multiplizität. Die geringe Übergangsrate ist der Grund für die lange Abklingzeit bei der Phosphoreszenz. Die Relaxation aus dem Triplett-Zustand in den Grundzustand kann auch strahlungslos erfolgen.

In der Regel geschieht die Energieaufnahme eines Moleküls ohne Änderung der Kernverteilung. Die Energie wird in eine Vibrations- und/oder eine Rotationsbewegung der Atome um den Massemittelpunkt umgewandelt. Zu jedem Zustand gehören demnach mehrere Vibrations- und Rotationsenergieniveaus. Letztere Energieabstände werden aufgrund ihres verschwindend kleinen Betrages bei Molekülen in Flüssigkeiten bei Raumtemperatur nicht aufgeführt. Die Vibrationsniveaus werden mit  $\nu$  (mit zunehmender Energie numerisch fortlaufend:  $\nu_0, \nu_1, \nu_2, \dots$ ) gekennzeichnet.

Die Fluoreszenzintensität  $I_F$  ist definiert als das Produkt von Quantenausbeute  $\phi$  (Verhältnis der Anzahl durch Fluoreszenz emittierter Photonen zur Anzahl absorbierter Photonen) und der absorbierten Intensität  $I_A$

$$I_F = \phi I_A = \phi \cdot (I_0 - I_L). \quad (3.1)$$

Die Differenz der einfallenden Intensität  $I_0$  und der austretenden Intensität  $I_L$  ergibt dabei die Intensität  $I_A$  der absorbierten Strahlung. Das Lambert-Beer'sche Gesetz beschreibt die austretende Intensität  $I_L$  bei bekannter Teilchenkonzentration  $c$ , dem

### 3. Methoden und experimenteller Aufbau

Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  und der von der Strahlung zurückgelegten Strecke  $l$  zu

$$I_L = I_0 \cdot e^{-\epsilon \cdot c \cdot l}. \quad (3.2)$$

Aus beiden Gleichungen ergibt sich der Zusammenhang

$$I_F = \phi \cdot I_0(1 - e^{-\epsilon \cdot c \cdot l}). \quad (3.3)$$

Hat man eine verdünnte Lösung vorliegen, von der die Strahlung nicht wesentlich abgeschwächt wird, reduziert sich der Ausdruck auf

$$I_F = \phi \cdot I_0 \cdot \epsilon \cdot c \cdot l, \quad (3.4)$$

wobei  $\phi$  und  $\epsilon$  im Allgemeinen wellenlängenabhängig sind. Das Fluoreszenzsignal ist damit direkt proportional zur Anzahl der Teilchen im Grundzustand und zur einfallenden Intensität  $I_0$ . Die Linearität bezüglich  $I_0$  kann gestört werden, wenn eine (fast) vollständige Entvölkerung des Grundzustandes stattfindet. Durch eine weitere Zunahme von  $I_0$  wird keine vermehrte Absorption und somit keine erhöhte Fluoreszenz hervorgerufen. Man spricht dann von einer Sättigung der Fluoreszenz. Eine Steigerung der Intensität  $I_0$  kann auch zur Zerstörung der Teilchen führen, die dann für eine erneute Fluoreszenz nicht mehr zur Verfügung stehen [81].

#### 3.1.1. Fluoreszenzfarbstoffe

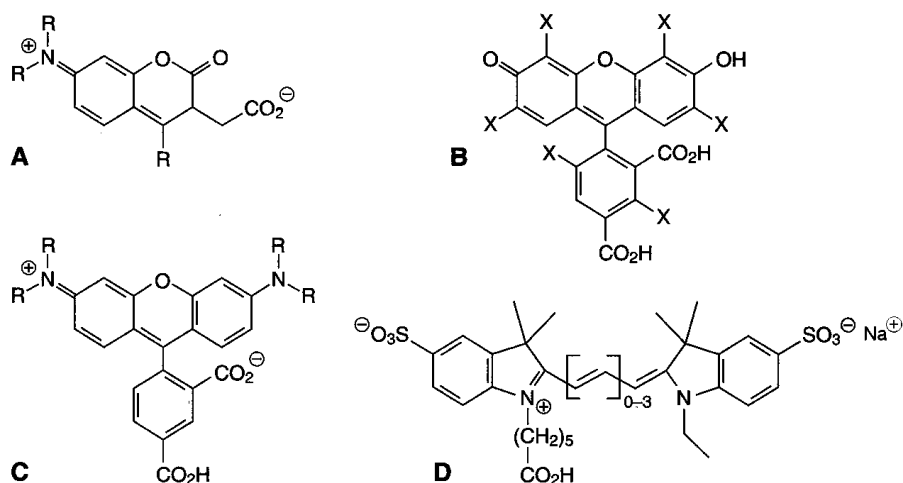
Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen in der Bioanalytik hat im Zuge der sich ständig weiterentwickelnden Laser- und Detektionssysteme in den letzten Jahren immer mehr zugenommen. Gekoppelt an Proteine, Oligonukleotide oder Antikörper finden sie in vielen bildgebenden Verfahren Anwendung. Je nach apparativen Voraussetzungen (Lichtquelle, Filtersätze, zu untersuchende biologische Proben) wählt man einen geeigneten Fluorophor entsprechend der gewünschten Anwendung aus.

Als Fluoreszenzfarbstoffe werden meist organisch-chemische Substanzen mit ausgedehnten (konjugierten) Elektronensystemen eingesetzt, die nach Anregung mit elektromagnetischer Strahlung Licht aussenden [30]. Neben Fluorescein, das der Substanzklasse ihren Namen gegeben hat, stellen Cumarine, Rhodamine und Cyaninfarbstoffe weitere bekannte Vertreter dar (siehe Abb. 3.2). Je ausgedehnter das konjugierte Elektronensystem ist, desto langwelliger absorbieren und emittieren die Farbstoffe.

Neben ihren spektralen Daten, wie Absorptions- und Emissionswellenlängen, sind die wichtigen Kenngrößen der Fluoreszenzfarbstoffe die Quantenausbeute  $\Phi$ , die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  und der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$ . Die Quantenausbeute beschreibt das Verhältnis von emittierten Photonen zu absorbierten Photonen über einen bestimmten Spektralbereich und liegt demnach bei Werten zwischen 0 und 1. Bei Cyaninfarbstoffen liegt die Quantenausbeute bei Werten um 0,2 und bei Fluoresceinen und Rhodaminen um 0,75. Die mittlere Lebensdauer der angeregten



### 3.1. Grundlagen der Fluoreszenz



**Abbildung 3.2.:** Chemische Basisstrukturen verbreiteter Fluoreszenzfarbstoffe. A) Coumarine, B) Fluoresceine, C) Rhodamine, D) Cyanine; R: Wasserstoff oder Alkylrest, X: Halogen oder Wasserstoff [30].

Zustände, die unter Fluoreszenz relaxieren, bezeichnet man als Fluoreszenzlebensdauer, die im Allgemeinen wenige Nanosekunden beträgt. Ein Maß für die Farbtintensität einer Substanz stellt der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  (in  $\text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) dar, der nur am Absorptionsmaximum angegeben wird. Er ist ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung der Strahlung mit dem Medium und eine von der Wellenlänge der einfallenden Strahlung abhängige Stoffkonstante:

$$\epsilon = \frac{E}{c \cdot x}, \quad (3.5)$$

wobei  $E$  die Extinktion (dekadischer Logarithmus des Verhältnisses der Ausgangsintensität  $I_0$  und der hinter der Probe gemessenen Intensität  $I$ ) und  $c$  die Konzentration bezeichnen. Die Intensität der Strahlung nimmt, entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz exponentiell mit der in einem Medium zurückgelegten Distanz durch Absorption ab (siehe Kapitel 3.1). Ein Zusammenspiel von hoher Quantenausbeute  $\Phi$  und hohem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  charakterisiert einen idealen Fluorophor. Diese Eigenschaften lassen sich in der Praxis nur schwer realisieren, da die Abhängigkeit der genannten Parameter voneinander sehr komplex ist. Außerdem können sich die Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe in gebundener Form stark verändern, so z.B. bezüglich Aggregation und Quenching (Fluoreszenzlöschung). Es ist daher besonders schwierig bis unmöglich, den perfekten Farbstoff eine spezifische Applikation zu finden. Anhand von Gleichung 3.4 wird deutlich, dass ein Farbstoff mit höherer Quantenausbeute nicht automatisch stärker fluoresziert. Zusätzlich hängt die Stärke der Fluoreszenz meistens auch vom pH-Wert ab, wie bei der Gruppe der Fluoresceine, deren Fluoreszenz mit einer relativ hohen Quantenausbeute von 0,8 erst ab einem pH-Wert von 7,0 einsetzt. Durch ihre geringe Photostabilität

### 3. Methoden und experimenteller Aufbau

eignen sie sich für einige Anwendungen nur begrenzt.

Im Gegensatz dazu besitzen Rhodamine eine hohe Photostabilität und über einen weiten Bereich stabile Quantenausbeuten, deren Werte nur geringfügig unter denen der Fluoresceine liegen. Bei der Kopplung an Proteine ist allerdings ein relativ ausgeprägtes Quenching zu beobachten, das mit zusätzlichen hydrophilen Gruppen reduziert werden kann. Bei sulfonierten Cyaninfarbstoffen sind Quantenausbeute und Photostabilität geringer als bei Rhodaminen, aber sie besitzen höhere Extinktionskoeffizienten und eine bessere Wasserlöslichkeit. Für Anwendungen, bei denen eine geringe Hintergrundfluoreszenz gefragt ist sowie als Marker für Proteine eignen sie sich demnach besonders gut.

Im Allgemeinen reagieren Fluoreszenzfarbstoffe stark auf das sie unmittelbar umgebende Milieu. In der Praxis muss diese Eigenschaft berücksichtigt werden. Zu den beeinflussenden Faktoren gehören nicht nur Hydrophilie und Hydrophobizität des umgebenden Mediums, sondern auch Temperatur, Viskosität, Ionenstärke und pH-Wert. In gebundener Form kann ein solcher Farbstoff also nicht mit seiner ungebundenen Form verglichen werden. Die Proteinumgebung führt zu einer Reihe von Vorgängen, wie z.B. die Fluorophor-Protein-Wechselwirkung, die zu einer Fluoreszenzlöschung führen können. An dieser Stelle muss Fluoresceinisothiocyanat (FITC) genannt werden. Es handelt sich dabei um ein aminreaktives Fluoresceinderivat, das bei einem Markierungsgrad von  $< 5$  gute Resultate bezüglich der Fluoreszenz liefert.

Der Markierungsgrad berechnet sich aus dem molaren Verhältnis zwischen Fluorophor und Protein:

$$M = \frac{c_F}{c_P}. \quad (3.6)$$

Dabei bezeichnet  $c_F$  die Konzentration des Fluorophors und  $c_P$  die Konzentration des Proteins. Bei höherem Markierungsgrad treten erhebliche Quenching-Effekte auf. Im Allgemeinen führt eine hohe Nettoladung der Fluorophore zu einer Reduzierung der Wahrscheinlichkeit einer Fluoreszenzlöschung durch Quenching-Effekte bei Kopplung an ein Protein. Mit zunehmender Hydrophobizität der Farbstoffe steigt auch die Wahrscheinlichkeit für Quenching-Effekte [30].

Klassische Fluorophore, die sich mittels UV-Licht oder sichtbarem Licht anregen lassen, haben die größte praktische Bedeutung. Sie lassen sich über einen weiten Spektralbereich anregen. Regt man mit nur einer Wellenlänge des Absorptionsspektrums an, ändert sich lediglich die Amplitude des Emissionsspektrums. Je näher die Anregungswellenlänge am Maximum des Absorptionsspektrums liegt, desto größer ist die Amplitude des Emissionsspektrums und damit das Fluoreszenzsignal. Bei ausreichender Intensität können Fluoreszenzfarbstoffe also auch weit unterhalb ihres Absorptionsmaximums angeregt werden.

Die kommerziell erhältlichen Fluoreszenzfarbstoffe wurden in den letzten Jahren verbessert und auf die jeweiligen Anwendungen in den Lebenswissenschaften angepasst. Dazu gehört die Entwicklung sulfonierter Cyaninfarbstoffe, die dadurch Wasserlöslichkeit erlangten und unter dem Markennamen *CyDyes* erhältlich sind. Außerdem wurden sulfonierte Rhodamine unter dem Namen *Alexa Fluor* entwi-

### 3.1. Grundlagen der Fluoreszenz

ckelt. Sie haben eine höhere Wasserlöslichkeit als herkömmliche Rhodamine. Einen anderen Ansatz bieten die unter dem Namen *Oyster* bekannten Fluorophore, die eine Alternative zu bereits etablierten Farbstoffen darstellen. Dort werden abschirmende Gruppen in den Fluorophor eingeführt, die deren Elektronensystem wie eine Schale umgeben.

Neben allen Vorteilen, die Fluoreszenzlabels mit sich bringen, gibt es auch Nachteile, die gerade im Hinblick auf elektrophoretische Trennungen, wie die isoelektrische Fokussierung, ins Gewicht fallen. Amino-reaktive anionische Label wie FITC oder Alexa Fluor verändern die effektive Ladung der Analyte, an die sie gekoppelt werden. Dies wiederum hat Auswirkung auf die elektrophoretische Mobilität der Analyte [54, 82]. Sie verändern nachweislich signifikant den pI der Proteine, an die sie gekoppelt sind und verfälschen dadurch die Analyse [83].

#### 3.1.2. Fluoreszenzdetektion mit der EMCCD-Kamera

Das zu analysierende Fluoreszenzsignal wird mit Hilfe einer *EMCCD*-Kamera (iXon, Andor Technology, Lot Oriel, Darmstadt, Deutschland) detektiert. Es handelt sich dabei um einen Bildsensor, der ohne einen Bildverstärker Einzelphotoneneffekte aufnehmen kann. Bis zu 95 % der Quanteneffizienz (QE) des Siliziumsensors kann in Kombination mit einem minimalen Rauschhintergrund genutzt werden. EMCCDs sind Halbleiter-Chips auf Silizium-Basis, die eine zweidimensionale Matrix an Pixeln beinhalten. Sie ähneln konventionellen CCD-Flächensensoren zur Aufnahme von Bildern, bei deren Auslesen die Ladung zunächst in ein vertikales Schieberegister verschoben wird und die jeweils herausfallende Ladung aus jeder CCD-Spalte in ein horizontales Schieberegister gelangt, welches im Bereich mehrerer Megahertz verschoben wird. Das Signal am Ausgang dieses Schieberegisters wird an den Ausleseverstärker (Strom-Spannungs-Wandler) übergeben. Im Unterschied zu CCD-Sensoren liegt bei EMCCD-Sensoren eine Erweiterung des Schieberegisters durch ein Verstärker-Register vor, wie in Abb. 3.3 dargestellt ist. Die Verstärkung kann mit Hilfe der Software derart erhöht werden, dass auch extrem schwache Signale über dem Ausleserauschen und bei jeder Auslesegeschwindigkeit detektiert werden können. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber CCD-Sensoren, bei denen die Kombination von Sensitivität und Geschwindigkeit sich gegenseitig ausschließen bzw. eine höhere Nachweisgrenze aufgrund des schnellen Auslesens der Pixel bedeuten. Das Verstärker-Register ist im Wesentlichen eine Kette von Pixeln, über die die Signalladung transferiert wird. In jeder Pixeleinheit des Verstärkungsregisters wird eine der Elektroden, die für den Ladungstransfer verantwortlich ist, durch zwei Elektroden ersetzt. Die erste wird auf einem festen Potential gehalten, während die zweite normal getaktet ist, außer dass viel höhere Spannungen (Amplituden zwischen 40V und 60V) genutzt werden als für den Ladungstransfer alleine nötig sind. Das starke elektrische Feld, das sich zwischen der festen Elektrode und der getakteten Elektrode ausbildet, ist hoch genug für die Elektronen, um beim Transfer eine Elektronenstoßionisation auszulösen. Diese Stoßionisation führt zur Bildung neuer Elektronen in

### 3. Methoden und experimenteller Aufbau

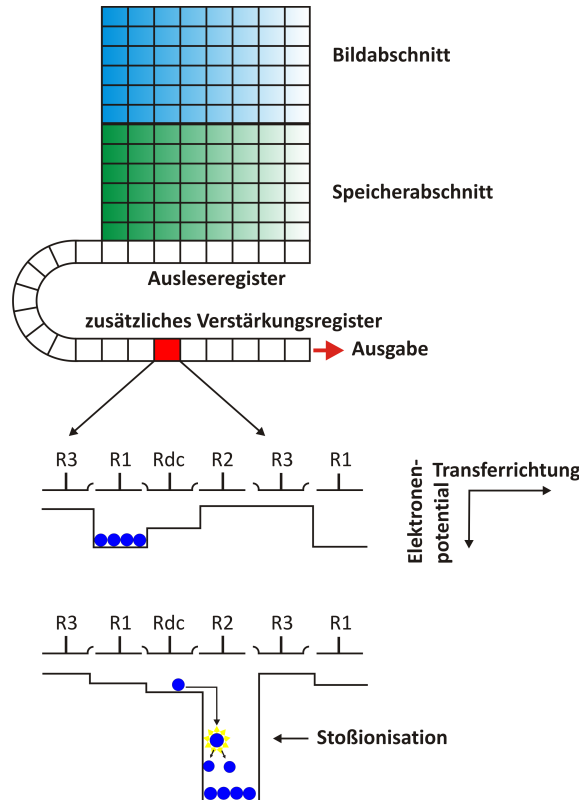


Abbildung 3.3.: EMCCD-Technologie (nach Andor Technology)

probabilistischer Weise durch Multiplikation oder Verstärkung. Die Wahrscheinlichkeit einer Stoßionisation pro Transfer ist relativ klein ( $P < 2\%$ ), aber aufgrund der großen Anzahl der Transferstufen (typischerweise mehr als 500) kann die Gesamtverstärkung beträchtliche Werte annehmen. Das Verstärkungsverhalten eines Systems mit vielen Stufen und hoher Gesamtverstärkung kann durch die folgende stochastische Gleichung genähert werden

$$P(n) = \frac{(n - m + 1)}{(m - 1)! (g - 1 + \frac{1}{m})^m} \exp\left(-\frac{n - m + 1}{g - 1 + \frac{1}{m}}\right), \quad (3.7)$$

wobei  $n \geq m$ .  $P$  ist die Wahrscheinlichkeit für  $n$  Ausgangselektronen bei  $m$  Eingangselektronen und einer Gesamtverstärkung von  $g$ . Durch das Einfügen des Elektronen-Verstärkungsabschnittes vor dem Ausgabe-Verstärker wird das Signal über das Ausleserauschen erhöht; demzufolge wird das Ausleserauschen effektiv reduziert.

Das Schieberegister läuft unterhalb und parallel zu den lichtsammelnden Zeilen. Es hat die gleiche Anzahl an Pixeln, ist aber, genau wie das Verstärkerregister, zum Schutz vor Licht abgedeckt. Fällt Licht auf ein Element, werden Elektronen (Photoelektronen) produziert. Wird ein Bild oder Lichtmuster auf das Array projiziert, entsteht ein entsprechendes Ladungsmuster. Um das Bildmuster elektronisch zu erfassen, muss das Ladungsmuster auf den Bildbereich des EMCCD-Chips transferiert werden. Das wird anhand einer Serie von transparenten Elektroden erreicht,

### 3.2. Konstruktion des miniaturisierten Frei-Fluss-Elektrophorese-Chips

die das Array umfassen. Bei entsprechender Taktung können die Elektroden genutzt werden, um das gesamte Ladungsmuster zeilenweise vertikal ins Schieberegister zu transferieren, welches ebenfalls eine Serie von Elektroden besitzt. Diese Elektroden werden zum pixelweisen horizontalen Transfer der Ladungspakete genutzt, so dass die Ladung des jeweils letzten Pixels des Schieberegisters in das Verstärkungsregister verschoben wird. Die Ladung wird in den Ausgabe-Knoten des „on-chip“ Verstärkers übergeben. Die Ausgabe des Verstärkers versorgt den Analog-zu-Digital (A/D)-Wandler, der jedes Ladungspaket in eine 14/16-bit-Binärzahl umwandelt. Dies geschieht, bis das gesamte Bild ausgelesen ist.

Bei ansteigender Verstärkung muss ab einem gewissen Wert mit Einbußen im dynamischen Bereich gerechnet werden, nämlich dann wenn die Verstärkung bezüglich der Elektronen dem Ausleserauschen gleicht. Um den dynamischen Bereich so groß wie möglich zu halten, sollte die Verstärkung nicht höher als nötig gewählt werden, um ein Signal zu messen. Da die Verstärkung mit der Temperatur variiert, sollte auf eine kontinuierliche Kühlung geachtet werden. Erst dann ist eine stabile Verstärkung gewährleistet. Dunkelstromrauschen tritt bei EMCCD-Systemen genauso auf, wie in konventionellen CCD-Systemen. Mit der Erhöhung des thermoelektrischen Kühlens kann aber auch dieses minimiert werden.

### 3.2. Konstruktion des miniaturisierten Frei-Fluss-Elektrophorese-Chips

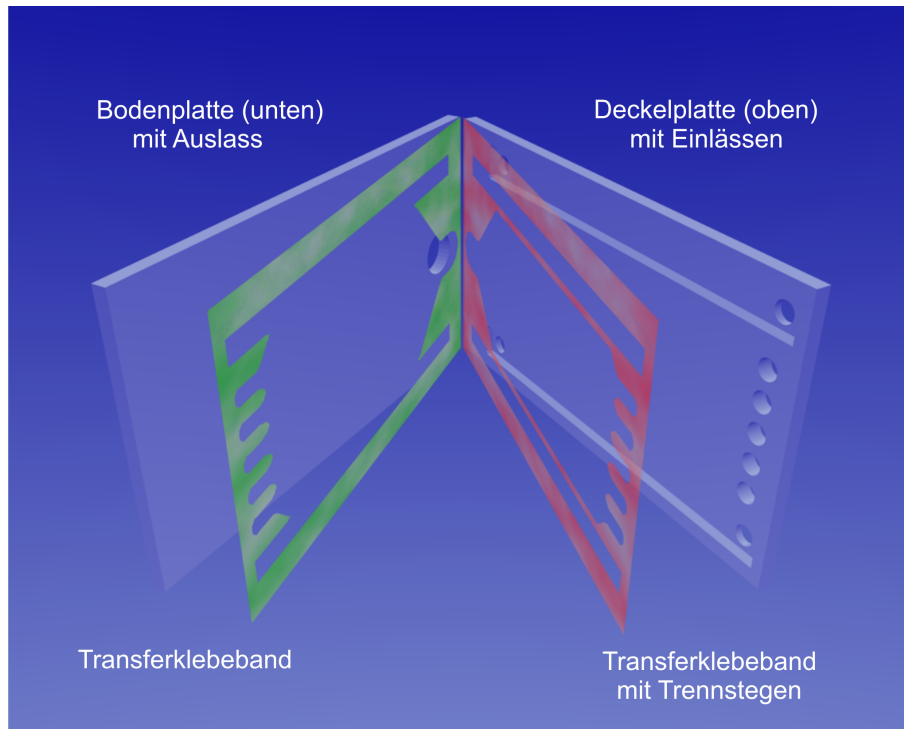
Mit dieser Arbeit wird die Konstruktion eines mikrofluidischen Frei-Fluss-Elektrophorese-Chips vorgestellt, der es ermöglicht, unterschiedliche biologische Systeme innerhalb kurzer Zeit aufzutrennen. Die Bauweise des  $\mu$ FFE-Chips und erste Ergebnisse wurden in [84] veröffentlicht.

Um kontinuierliche Banden separierter Komponenten zu erhalten, wird ein elektrisches Feld senkrecht zur Flussrichtung angelegt. Der Analytstrom wird vom Trennmedium beidseitig über hydrodynamische Fokussierung eingefasst.

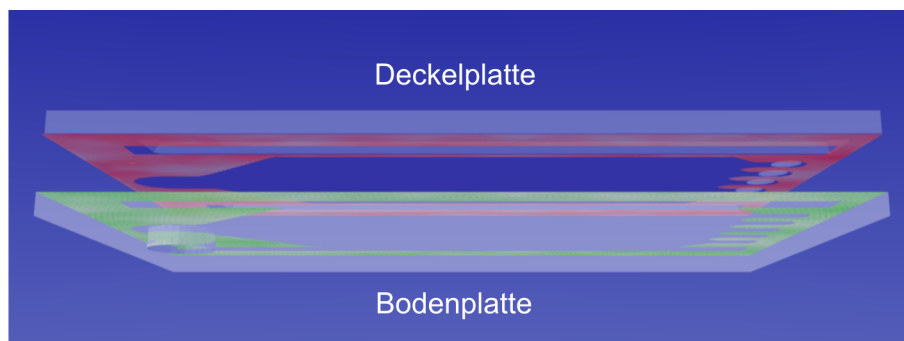
Inhalt dieser Arbeit ist die Konstruktion eines mikrofluidischen Frei-Fluss-Elektrophorese-Chips mittels dessen es möglich ist, unterschiedliche biologische Systeme innerhalb kurzer Zeit aufzutrennen. Um kontinuierliche Banden separierter Komponenten zu erhalten, wird ein elektrisches Feld senkrecht zur Flussrichtung angelegt. Der Analytstrom wird vom Trennmedium beidseitig über hydrodynamische Fokussierung eingefasst.

Die Bauweise des Chips beruht auf der Multilaminationstechnik. Wie in Abb. 3.4 und 3.5 dargestellt ist, besteht der Chip aus zwei Polymethylmethacrylat (PMMA)-Platten (Acrylglas XT, Evonik Röhm GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit den Abmessungen  $26\text{ mm} \times 76\text{ mm} \times 1,5\text{ mm}$ . Diese Platten sind für die Zuführung der entsprechenden Lösungen über Schläuche an den dafür vorgesehenen Stellen mit Löchern versehen. Zur hydrodynamischen Isolation der Elektroden vom Trennraum

### 3. Methoden und experimenteller Aufbau



**Abbildung 3.4.:** Bauweise des  $\mu$ FFE-Chips. Zwischen zwei PMMA-Platten ( $26 \text{ mm} \times 76 \text{ mm} \times 1,5 \text{ mm}$ ) befinden sich zwei Transferklebebänder (grün und rot) mit einer Höhe von jeweils  $25 \mu\text{m}$ , von denen eines (rot) zwei Trennstege aufweist. Sie definieren die Struktur des Trennraumes für die FFE.



**Abbildung 3.5.:** Anordnung der Komponenten des  $\mu$ FFE-Chips. Die Transferklebebänder werden zunächst jeweils auf die Boden- und Deckelplatte geklebt und dann zusammengefügt.

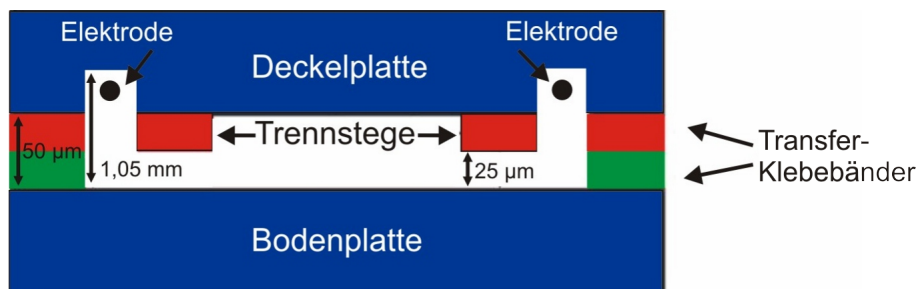
werden diese in eingefrästen Vertiefungen in der Deckelplatte fixiert. Anhand zweier Transferklebebänder (Optically Clear Adhesives, 3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland), von denen das obere zwei Trennstege aufweist, wird die Struktur von Trenn- und Elektrodenraum festgelegt und die Strömung im Trennraum von der im Elektrodenraum soweit abgeschirmt, dass Gasblasen, die während der Elektrolyse an den Elektroden entstehen, nicht in den Trennraum eintreten. Um eine elektrische

### 3.2. Konstruktion des miniaturisierten Frei-Fluss-Elektrophorese-Chips

Verbindungen sicherzustellen wird gleichzeitig ein Ionenaustausch ermöglicht. Bearbeitet wurden die Materialien mit einem Laserschneidsystem (Professional Laser Series 4.60, Universal Laser System Inc., Wien, Österreich). Das Chip-Design wurde mit Corel Draw 13 erstellt.

Nach dem Zuschneiden der Chip-Komponenten wurden die PMMA-Platten gereinigt. Für die Reinigung wurde Scotch-Weld Cleaner Spray (3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) und demineralisiertes Wasser verwendet. Danach wurden die Platin-Elektroden (99,9 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in die dafür vorgesehenen Elektrodenbetten integriert. Nun können alle Komponenten entsprechend Abb. 3.4 kombiniert werden.

Für eine dauerhafte Festigkeit fand abschließend die Bearbeitung mittels einer Presse (Druckpresse Geko PK 120, GEKO-Pressen KG, Offenbach/Main, Deutschland) statt. Polytetrafluorethylen (PTFE)-Schläuche (Postnova Analytics GmbH, Landsberg/Lech, Deutschland) für die Flüssigkeitszuführung wurden in den dafür vorgesehenen Löchern im Chip befestigt und mit Zwei-Komponenten Epoxidharz-Kleber (2-Komponenten-Klebstoff "plus schnellfest", UHU) fixiert.

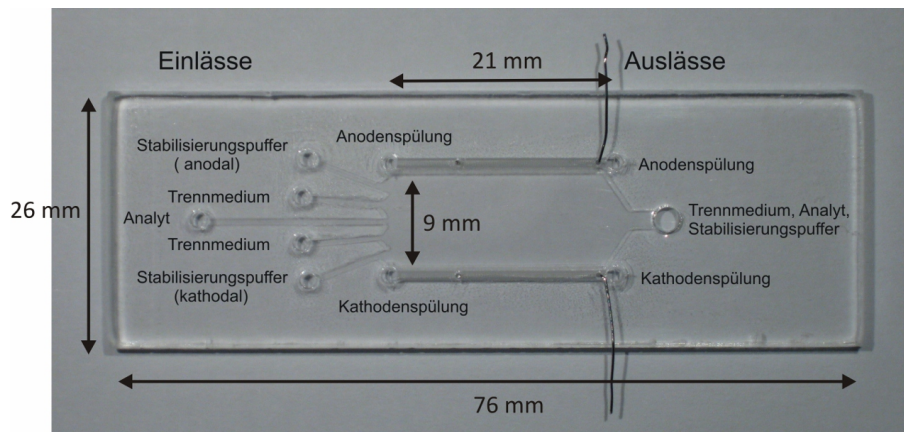


**Abbildung 3.6.:** Chip im Querschnitt. Das obere Transferklebeband (rot) unter der Deckelplatte generiert die Trennstege. Aufgrund der in die Deckelplatte gefrästen Elektrodenkanäle und der geringen Höhe der Transferklebebänder von jeweils 25  $\mu\text{m}$  werden an den Elektroden während der Elektrolyse entstehende Gasblasen daran gehindert, in den Trennraum einzutreten. In den Elektrodenkanälen sind Platin-Elektroden fixiert.

In Abb. 3.6 ist der Chip im Querschnitt dargestellt. Die PMMA-Platten haben jeweils eine Stärke von 1,5 mm, die Transferklebebänder messen jeweils 25  $\mu\text{m}$  und bestehen aus trägerfreiem Acryl-Kleber. Dieser zeichnet sich besonders durch seine hohe Alterungs- und Temperaturbeständigkeit sowie seine weitgehende Unempfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung und Oxidation aus.

Insgesamt hat der Trennraum also eine Höhe von 50  $\mu\text{m}$ . In die Deckelplatte wurden zwei Elektrodenbetten mit einer Höhe von 1 mm geätzt. Als Elektroden wurde Platindraht mit einem Durchmesser von 0,3 mm genutzt. Entstehende Gasblasen sammeln sich an der Oberseite des Chips in den Elektrodenbetten und werden zusätzlich durch die Trennstege vom Übergang in den Trennraum abgehalten.

### 3. Methoden und experimenteller Aufbau



**Abbildung 3.7.:** Bauweise des Chips in der Aufsicht mit Abmessungen. Die Flüssigkeitsversorgung erfolgt mittels Absaugen über die Auslässe mit Spritzenpumpen. Der Trennraum hat eine Füllkapazität von ca.  $9,5 \mu\text{l}$ .

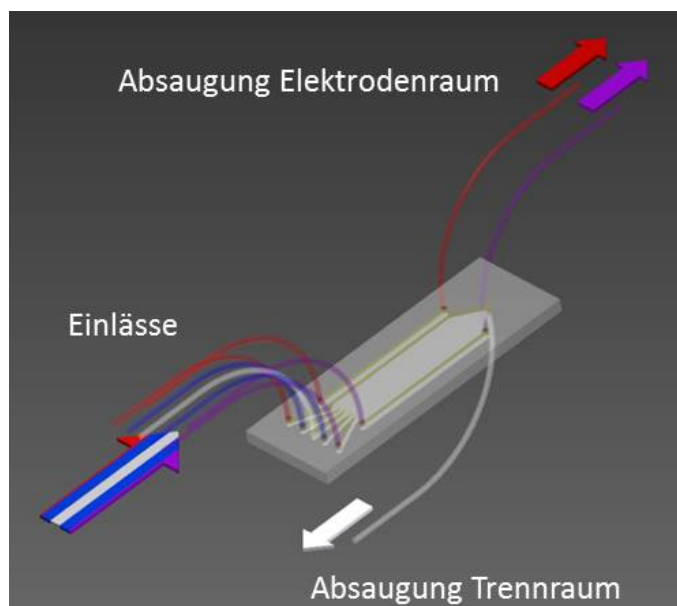
Der Trennraum hat eine Länge von 21 mm, eine Breite von 9 mm, eine Höhe von  $50 \mu\text{m}$  und besitzt eine Füllkapazität von ca.  $9,5 \mu\text{l}$ . Der entwickelte Chip hat einen Einlass für den zu untersuchenden Analyt und jeweils zwei Einlässe für das Trennmedium, den Stabilisierungspuffer und die Elektrodenspülungen (siehe Abb. 3.7). Außerdem sind drei Auslässe vorhanden. Zwei davon sind für die Elektrodenspülungen vorgesehen und einer für den gesamten Trennraum, der Trennmedium, Stabilisierungspuffer und Analyt beinhaltet. Jeder Einlass und die zwei Auslässe für die Elektrodenspülungen haben einen Durchmesser von 1,5 mm. Der Auslass für den Trennraum hat einen Durchmesser von 3 mm. Die Platinelektroden haben jeweils eine Länge von ca. 25 mm und wurden in den Elektrodenbetten fixiert, wobei die Anteile außerhalb des Chips als Kontakte für die Spannungsquelle dienen.

Die Versorgung des Chips mit den entsprechenden Lösungen mit Ausnahme des Analytmediums, das in den Chip gepumpt wurde, erfolgt mittels Absaugen über die Auslässe mit Hilfe von Spritzenpumpen (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland; TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) über PTFE-Schläuche mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm und einem Außendurchmesser von 1,5 mm (siehe Abb. 3.8). Für den Auslass des Trennraumes wurde ein TYGON®-Schlauch mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm und einem Außendurchmesser von 3 mm verwendet.

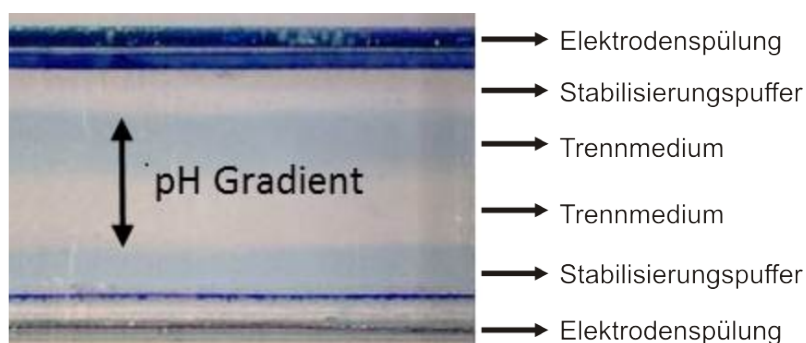
Die Linearität des Strömungsprofils ist in Abb. 3.9 dargestellt. Der pH-Gradient erstreckt sich über die Ausdehnung des Trennmediums und wird beidseitig vom Stabilisierungspuffer eingeschlossen. Zur Verdeutlichung der verschiedenen Bereiche im Chip wurden die Kanäle abwechselnd mit Wasser und Methylenblau-Lösung versorgt. Der Stabilisierungspuffer definiert die Ausdehnung des Trennmediums im Kanal und somit Position und Ausdehnung des pH-Gradienten. Außerdem wird durch den Stabilisierungspuffer sichergestellt, dass auch separierte Komponenten mit ex-



### 3.2. Konstruktion des miniaturisierten Frei-Fluss-Elektrophorese-Chips



**Abbildung 3.8.:** Versorgung des  $\mu$ FFE-Chips mit den entsprechenden Lösungen. Außer der Analytlösung, die in den Chip gepumpt wird, werden alle Lösungen über Spritzenpumpen an- bzw. abgesaugt.



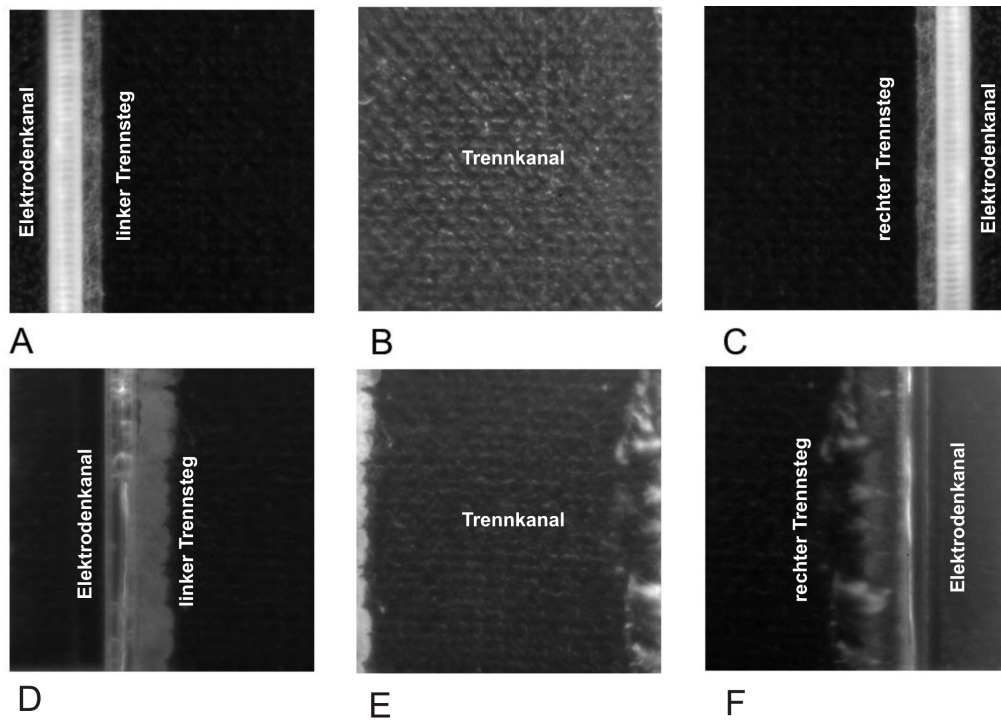
**Abbildung 3.9.:** Strömungsprofil im  $\mu$ FFE-Chip.

tremen pI-Werten im Trennkanal bleiben und nicht in die Elektrodenkanäle und somit aus dem Detektionsbereich heraus gelangen.

Von der Gesamtbreite des Chips werden für die Separation nur etwa 60 % bis 70 % genutzt, je nach Ausdehnung des Stabilisierungspuffers im Trennkanal. Die Elektrodenkanäle werden im späteren Experiment mit kathodaler und anodaler Elektrodenpülung versorgt.

Wie in Abb. 3.10 zu sehen ist, haben die Trennstege eine begrenzte Haltbarkeit. Die Transferklebebänder werden von den verwendeten Chemikalien (schwache Säure und Base) und durch die Elektrolyse nach einiger Zeit negativ beeinflusst. Sie schwimmen auf und verändern ihre Struktur. Durch ihre zunehmende Verbreiterung ins Chipinnere wird die Ausdehnung des pH-Gradienten immer weiter eingegrenzt

### 3. Methoden und experimenteller Aufbau



**Abbildung 3.10.:** Trennstege und Trennkanal vor Messbeginn (A, B, C) und nach 20 Stunden Laufzeit (D, E, F).

und die Trennstege verlieren mehr und mehr ihre Funktion.

Polymere, wie auch das in dieser Arbeit verwendete PMMA, besitzen in der Regel negative Oberflächenladungen. Diese stehen in direktem Zusammenhang mit dem in Kapitel 2.3.2 beschriebenen elektroosmotischen Fluss. Messungen ergaben eine relativ geringe Oberflächenladungsdichte für PMMA von unter einer Ladung pro Quadratnanometer [85]. Die Debye-Länge  $\lambda$  (vgl. Kapitel 2.2.1) beträgt in Elektrolyten je nach Elektrolytkonzentration zwischen 1 nm und 10 nm. Die Höhe des in dieser Arbeit konzipierten Elektrophorese-Chip beträgt hingegen  $50 \mu\text{m}$ . Der Einfluss des EOF auf dieser, im Vergleich zur gesamten Chiphöhe, kleinen Ausbreitungslänge wird als sehr gering eingestuft.

### 3.3. Experimenteller Aufbau

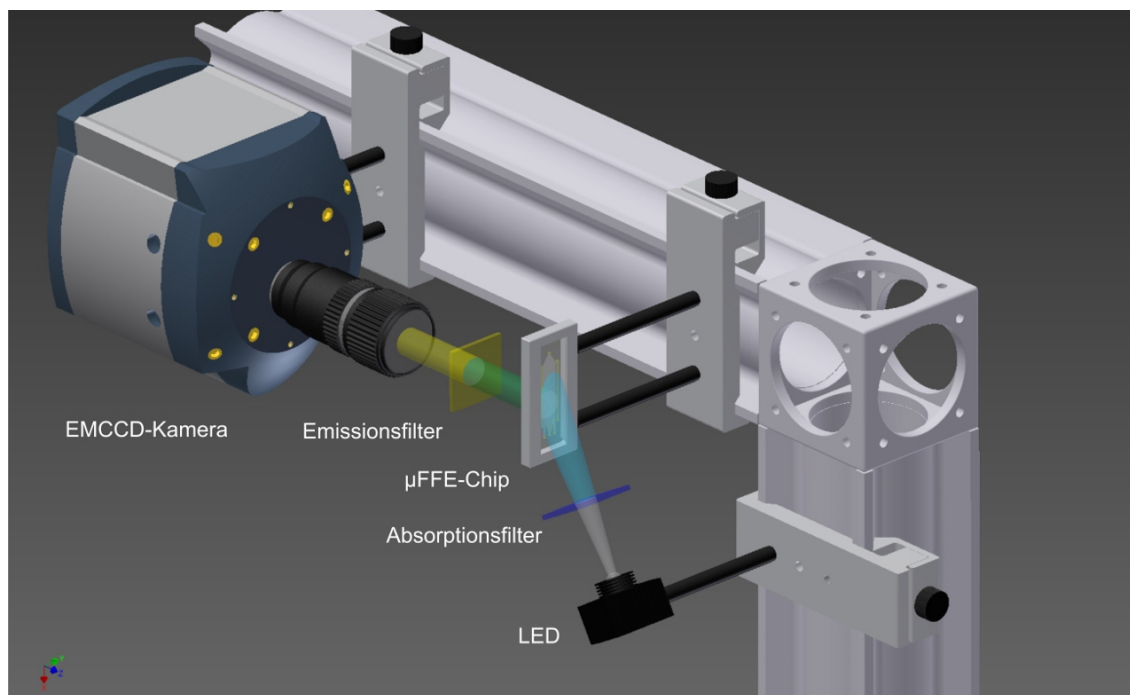


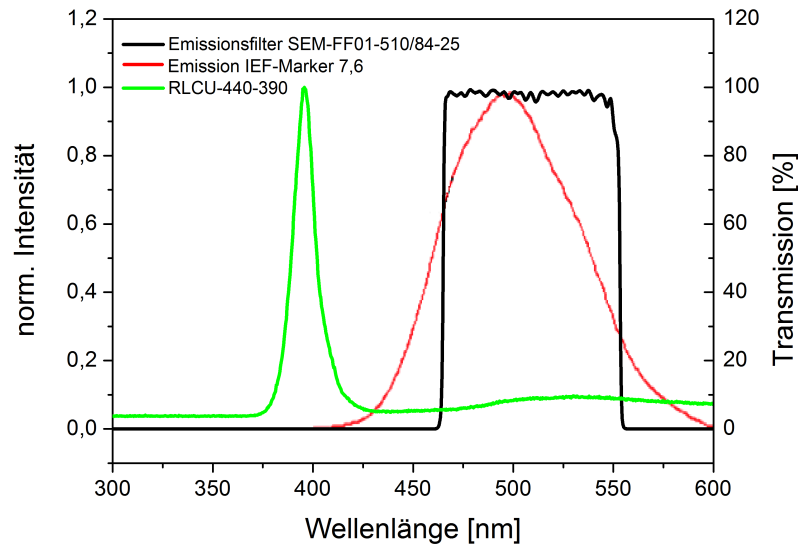
Abbildung 3.11.: Experimenteller Aufbau.

In Abb. 3.11 ist die optische Detektionsmethode der laserinduzierten Fluoreszenz zur Überwachung des Separationsvorganges dargestellt. Für die Anregung der IEF-Marker wurde eine LED (RLCU-440-390, Roithner Lasertechnik GmbH, Wien, Österreich) eingesetzt. Die Absorptionsmaxima der IEF-Marker liegen zwischen 385 nm und 396 nm und die Fluoreszenzmaxima zwischen 495 nm und 500 nm. Detektiert wurde mit einer EMCCD-Kamera. Dazu wurde ein Objektiv der Firma Canon (Lens FD 50mm) eingesetzt. Um das Rauschsignal zu minimieren und die Intensitätsauflösung der Kamera zu erhöhen, wurde ein Emissionsfilter (SEM-FF01-510/84-25, Laser 2000 GmbH, Wessling, Deutschland) verwendet. Als pH-Indikator im unteren pH-Bereich wurde Methylrot ( $pI = 4,0$  pH) verwendet.

In Abb. 3.12 sind die Spektren der Anregung durch die LED, der Emission des IEF-Markers 7,6 (stellvertretend für alle verwendeten IEF-Marker, die ähnliche Spektren aufweisen) und des Emissionsfilters dargestellt. Das Emissionsmaximum der LED liegt genau im Bereich der Anregung der IEF-Marker.

Die Experimente mit gelabelter ssDNA und gelabelten Proteinen wurden mit Hilfe einer LED (LED470-66-16100, Roithner Lasertechnik GmbH, Wien, Österreich) durchgeführt. Die Absorptionsmaxima der Fluoreszenzlabel Alexa Fluor®488, FITC und ATTO 488 liegen bei 495 nm und 501 nm und die Fluoreszenzmaxima bei 519 nm und 523 nm. Für die Fluoreszenzdetektion der Proteine und der ssDNA wurde wieder

### 3. Methoden und experimenteller Aufbau



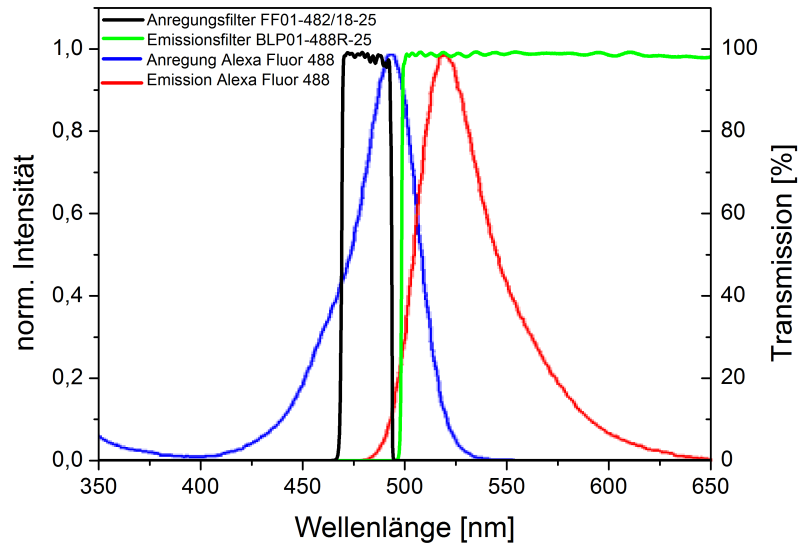
**Abbildung 3.12.:** Spektrum der LED RLCU-440-390 (grüne Linie), Emissionsspektrum des IEF-Markers 7,6 (rote Linie, Invitrogen.com) und Transmission des Emissionsfilters SEM-FF01-510/84-25 (schwarze Linie, Laser 2000 GmbH).

ein entsprechender Filtersatz (FF01-482/18-25, BLP01-488R-25, Laser 2000 GmbH, Wessling, Germany) eingesetzt. In Abb. 3.13 sind die Anregungs- und Emissionsspektren von Alexa Fluor®488 (stellvertretend für FITC und ATTO 488, die ein ähnliches Spektrum aufweisen) und des Anregungs- und Emissionsfilters dargestellt. Für die Experimente mit GFP (green fluorescent protein) wurde für die Anregung die LED RLCU-440-390 und der Emissionsfilter SEM-FF01-510/84-25 verwendet (siehe Abb. 3.14). In Abb. 3.15 ist die Transmissionskurve der verwendeten PMMA-Platten dargestellt. PMMA eignet sich für die Fluoreszenzdetektion ab einer Wellenlänge von ca. 375 nm. Die verwendeten Fluoreszenzlabel sind auf den optisch zugänglichen Bereich abgestimmt.

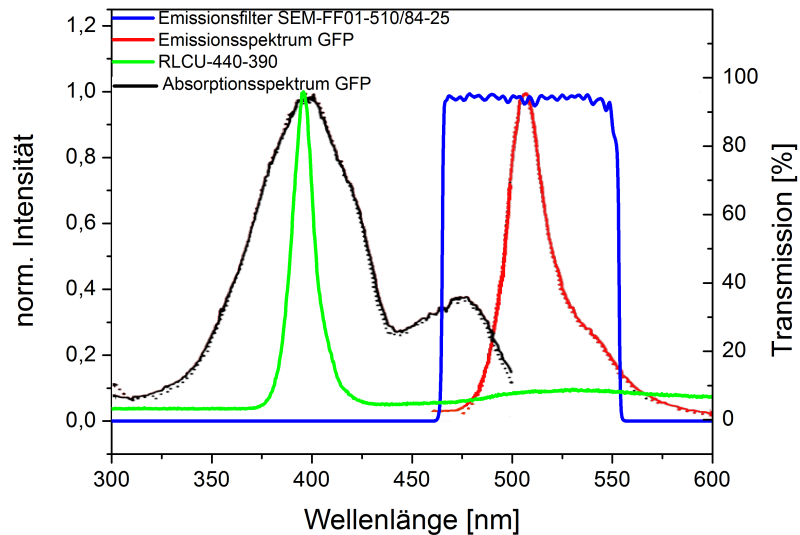
Effekte, die die FFIEF stören können, sind die in den Trennkanal eintretenden Gasblasen und eine Proteinausfällung am pI. An diesem ist die Löslichkeit relativ gering und kann zu einer nichtidealen und gestörten Fokussierung führen [1]. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) und Tween 20 eingeführt [20, 87]. HPMC ist ein Cellulose-Derivat, das, genau wie Tween 20, zu einer Reduzierung der Oberflächenspannung führt. Luftblasen werden so während des Füllvorganges leichter zu den Auslässen transportiert. Zusätzlich hat Tween 20 die Eigenschaft, die Löslichkeit der Komponenten in der Probe zu erhöhen [87, 88].

Ein anderer Effekt ist die Adsorption der Proteine an den Innenwänden des Chips. Adsorption des Analyten an den Oberflächen von Mikrokanälen führt immer zu einer

### 3.3. Experimenteller Aufbau



**Abbildung 3.13.:** Anregungs- und Emissionsspektrum von Alexa Fluor®488 (rote bzw. blaue Linie, Spektrum von Invitrogen.com) und Transmissionen des Anregungsfilters FF01-482/18-25 und Emissionsfilters BLP01-488R-25 (schwarze bzw. grüne Linie, Spektrum von Laser 2000 GmbH).



**Abbildung 3.14.:** Anregungs- und Emissionsspektrum von GFP (schwarze bzw. rote Linie) [86], Transmissionen des Emissionsfilters SEM-FF01-510/84-25, (blaue Linie, Spektrum von Laser 2000 GmbH) und Spektrum der LED RLCU-440-390 (grüne Linie).

Verschlechterung der Auflösung und der Reproduzierbarkeit [9]. Um diesen Effekt zu umgehen und die Chipoberfläche zu hydrophilisieren, wurde der Chip mit einer 2%igen Polyvinylalkohol (PVA)-Lösung, die in Tris-Puffer angesetzt, wurde für 15 Minuten inkubiert [9].

### 3. Methoden und experimenteller Aufbau

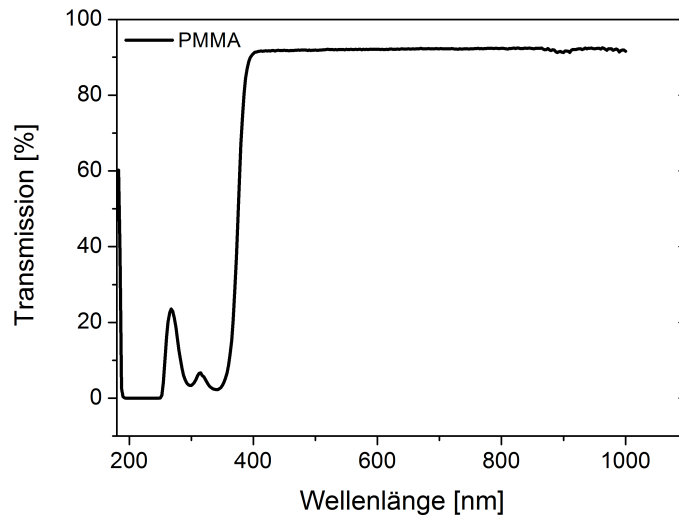
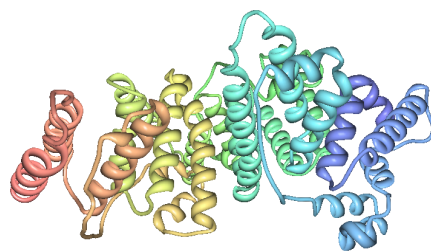


Abbildung 3.15.: Transmissionspektrum einer 1,5 mm dicken PMMA-Platte.

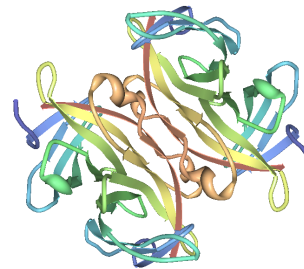
#### 3.3.1. Verwendete Proteine, Nukleinsäuren und Immunglobuline

##### Proteine und Nukleinsäuren

Albumin zählt zur Gruppe der globulären Proteine. Es besteht aus 584 bis 590 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von ca. 66.000 g/mol [89]. Im menschlichen Körper hat das Humanalbumin verschiedene Wirkorte. So ist es z. B. für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes und für die Wasserlöslichkeit vieler wasserunlöslicher Substanzen verantwortlich. In der Medizin wird es außerdem bei der Tumorerkennung und -behandlung eingesetzt [90]. In der Milch ist es als Lactalbumin und im Hühnereiweiß als Ovalbumin enthalten.



(a) Struktur von Albumin (Monomer)



(b) Struktur von Avidin (Dimer)

Abbildung 3.16.: Struktur der Proteine Albumin (a) und Avidin (b) (erstellt mit MPT (Molecular Biological Toolkit [91])).

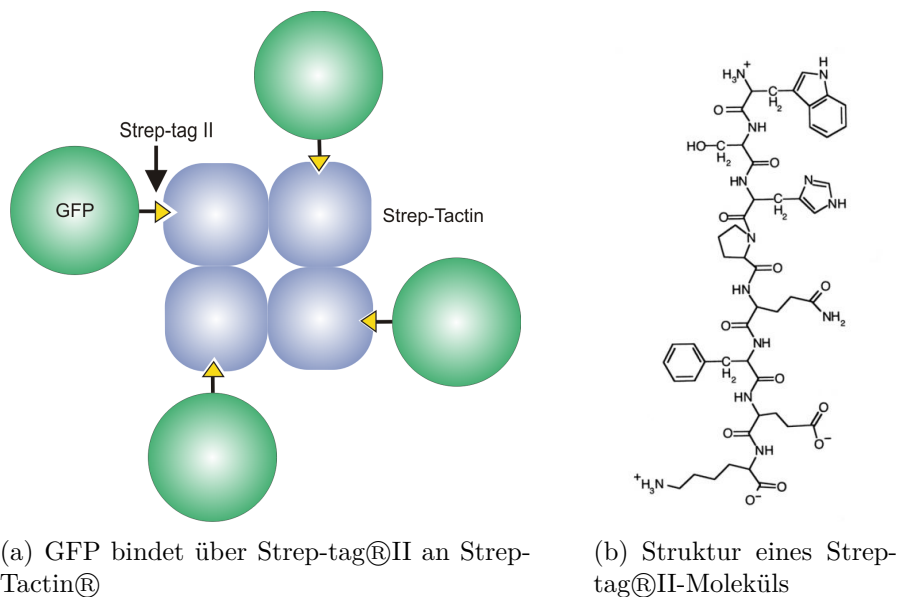
Das in dieser Arbeit eingesetzte Rinderalbumin (BSA, engl. *bovine serum albumin*) wird häufig in der Forschung z. B. bei immunologischen Nachweisverfahren

wie dem ELISA eingesetzt, um unspezifische Bindungen von Immunglobulinen an die Festphase zu verhindern [92]. Der pI liegt bei pH 4,7 [89]. Für die Experimente wurde mit FITC ( $\epsilon = 84.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (bei  $\lambda = 495 \text{ nm}$ ),  $\Phi = 0,93\%$  [93]) markiertes BSA verwendet.

Avidin ist ein tetrameres Glykoprotein mit vier Untereinheiten, bestehend aus jeweils 128 Aminosäuren. Es hat eine Molekülmasse von 66.000 g/mol und kann vier Biotin-Moleküle binden; der pI liegt bei pH 10,0-10,5. Für die Experimente wurde mit Alexa Fluor®488 ( $\epsilon = 71.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (bei  $\lambda = 494 \text{ nm}$ ),  $\Phi = 0,92\%$  [94]) markiertes Avidin verwendet.

Als Nukleinsäure kam ein mit ATTO 488 ( $\epsilon = 90.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\Phi = 0,80\%$ ) markiertes Oligonukleotid bestehend aus 15 Basen zum Einsatz. Dabei handelte es sich um den DNA-Einzelstrang 5'-GAGGTCGTATAGGGG-3' (ssDNA, engl. *single-stranded DNA*) mit einem pI von 5,5 (berechnet durch Sequence Manipulation Suite: Protein Isoelectric Point, vorgestellt in [95]).

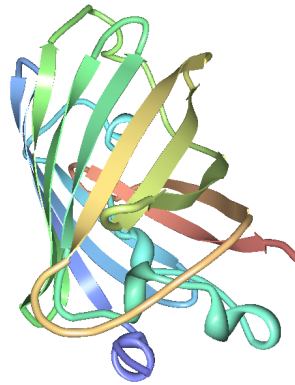
### Strep-Tactin® und GFP



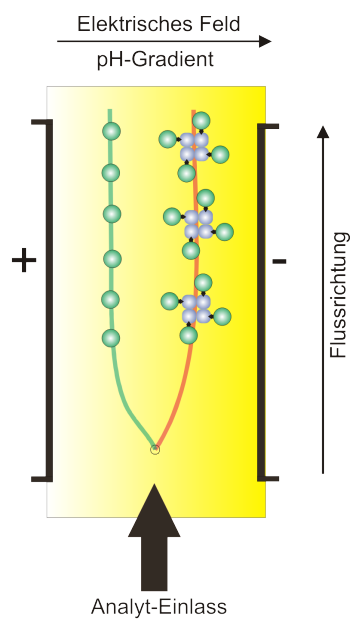
**Abbildung 3.17.:** Schematische Darstellung der Bindung eines GFP-Moleküls an Strep-Tactin® über Strep-tag®II (a) (nach [96]), Struktur des Strep-tag®II-Moleküls (b) ([96]).

Das Strep-tag®-Strep Tactin®-Prinzip wurde ausgehend von der bekanntlich starken Bindung von Biotin an Streptavidin zur Proteinaufreinigung entwickelt und findet zum größten Teil Einsatz in der Affinitäts-Chromatographie. Das Strep-

### 3. Methoden und experimenteller Aufbau



**Abbildung 3.18.:** Struktur eines GFP-Moleküls (erstellt mit MPT (Molecular Biological Toolkit [91])).



**Abbildung 3.19.:** Schematische Darstellung der IEF von GFP/Strep-Tactin® und GFP.

tag® II-Molekül, an das rekombinante Proteine mittels Peptidbindung binden, bindet an Strep-Tactin® und dient so als Aufreinigungsmatrix. Es ist ein synthetisch hergestelltes Peptid, das aus 8 Aminosäuren (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) besteht. Strep-Tactin® ist ein durch zufällige Mutagenese („random mutagenesis“) erzeugtes Derivat von Streptavidin, das als eines der stabilsten Proteine bekannt ist. Strep-tag® II bildet zu Strep-Tactin® eine starke, nicht-kovalente Bindung mit einer Dissoziationskonstante im mikromolaren Bereich. Dies erlaubt die schonende Dissoziation durch den Einsatz von Biotin oder Biotin-Derivaten. Strep-Tactin® hat ein Molekulargewicht von 13.342 g/mol; der pI liegt im neutralen pH-Bereich [96].

GFP (engl. *green fluorescent protein*) ist das grün fluoreszierende Protein aus



der Qualle *Aequorea victoria*. Es besteht aus 238 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 26.900 g/mol. Die Anregungsmaxima liegen bei 395 nm und 475 nm und die Emissionswellenlänge beträgt 509 nm. Der pI liegt bei pH 4,6 - 5,1 [97], die Quantenausbeute  $\Phi$  liegt bei 80% und der Extinktionkoeffizient  $\epsilon$  (bei  $\lambda = 397$  nm) beträgt 27.600 L mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> [97]. Anwendung findet GFP vor allem in der Zellbiologie, wo es als Marker für andere Proteine eingesetzt wird [86]. Außerdem eignet es sich für Untersuchungen im lebenden Organismus, da es auf nahezu alle eukaryontischen Zellen nicht toxisch wirkt.

Die isoelektrische Fokussierung von GFP und Strep-Tactin®/GFP ist ein weiteres Modell auf dem Weg zum Fluoreszenz-Immunoassay im miniaturisierten Frei-Fluss-Elektrophorese-Chip. Dabei wird eine Lösung angesetzt, in der GFP-Moleküle im Überschuss vorhanden sind. Strep-Tactin® bindet über Strep-tag® II an GFP. Bei einer elektrophoretischen Auftrennung sind so beide Komponenten, das GFP und der Strep-Tactin®/GFP-Komplex über Fluoreszenz detektierbar (siehe Abb. 3.19).

## Immunglobulin G

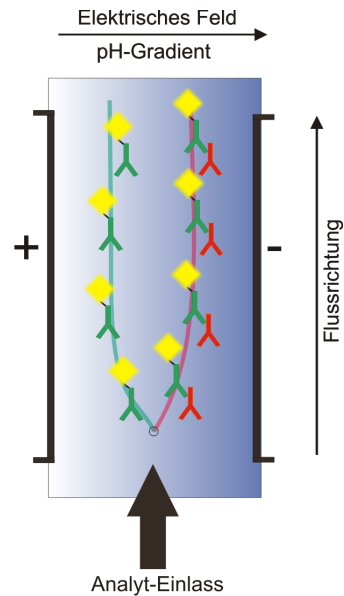
Der Durchführung eines Immunoassays im  $\mu$ FFE-Chip wird folgendes Modell zugrunde gelegt:

Es liegt ein Analyt vor, der auf ein bestimmtes Antigen untersucht werden soll. Der zu untersuchenden Lösung wird ein entsprechender markierter gegen das Antigen gerichteter Antikörper zugesetzt, so dass bei einer Bindung von Antigen und Antikörper der markierte Antikörper im Überschuss vorliegt. Befindet sich in der untersuchten Probe das Antigen, auf das getestet wird, wären bei der IEF zwei Banden sichtbar: das Antigen-Antikörper-System und der Antikörper selbst. Ist das Antigen nicht in der Probe vorhanden, wird nur der markierte Antikörper, also lediglich eine Bande detektiert, da kein Bindungspartner vorhanden ist.

Bei der durchgeführten Messung wird ein System aus zwei Antikörpern eingesetzt, von denen einer mit einem Fluoreszenzlabel markiert ist. Rabbit-IgG und Anti-Rabbit-IgG haben beide ein Molekulargewicht von 150.000 g/mol. Der pI von IgG liegt im Bereich pH 6,1-8,5 [98]. Rabbit-IgG fungierte als Primär-Antikörper und Anti-Rabbit-IgG (markiert mit Alexa Fluor 488®) als Sekundär-Antikörper. Der Sekundär-Antikörper, dessen Antigen in diesem Fall der Primär-Antikörper ist, bindet an diesen und ermöglicht so eine direkte Detektion des Primär-Antikörpers. Im Experiment wird, wie zuvor beim System Strep-Tactin® und GFP eine Lösung angesetzt, in der markiertes Anti-IgG im Überschuss vorhanden ist. Geht man nun davon aus, dass IgG und markiertes Anti-IgG eine Bindung eingehen, erwartet man während der IEF die Auftrennung in zwei Banden; das gebundene System IgG/Anti-IgG und das im Überschuss vorhandene Anti-IgG (siehe Abb. 3.20). Der experimentelle Vorteil dieser Methode im Vergleich zu etablierten Festphasenimmunoassays, wie dem ELISA, besteht vor allem in der Ersparnis der häufigen Waschschriffe (mindestens neun pro Assay) und der Behandlung der Mikrotiterplatte (Inkubationszeit von Fängerantikörper-Beschichtung (über Nacht), Blocklösung und Standards/Proben (über mehrere Stunden)). Die eingesetzten Fluoreszenzlabel sind oh-

### 3. Methoden und experimenteller Aufbau

ne Inkubationsschritte sofort auswertbar. Außerdem wird kein Fänger-Antikörper benötigt, da der Nachweis im freien Fluss ohne Festphase erfolgt. Dieser Immunoassay ermöglicht eine qualitative Aussage darüber, ob ein Analyt in einer Probe vorhanden ist oder nicht („Ja/Nein“-Nachweis).



**Abbildung 3.20.:** Schematische Darstellung der IEF IgG/Anti-IgG und IgG.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Charakterisierung des Detektionssystems

Um das Detektionssystem zu charakterisieren, muss die untere Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) ermittelt werden, bis zu der das Messsignal zuverlässig nachgewiesen werden kann. Eine standardisierte Methode, das LOD zu ermitteln, ergibt sich aus dem Mittelwert des Hintergrundsignals zuzüglich dem dreifachen Wert seiner Standardabweichung

$$\text{LOD} = x_B + 3\sigma_B, \quad (4.1)$$

wobei  $x_B$  der Mittelwert des Blindwertes und  $\sigma_B$  die Standardabweichung des Blindwertes sind. Vor jeder Messung wurde eine Aufnahme des Hintergrundes gemacht. Um Streulichteffekte zu minimieren wurde der Hintergrund automatisch von der Kamerasoftware pixelweise von der späteren Messaufnahme abgezogen. Die Messung des Hintergrundes wurde unter exakt denselben Bedingungen durchgeführt, wie die darauffolgende Messung, nur ohne Fluoreszenzsignal. Damit wird gewährleistet, dass in der sich anschließenden Messung des Signals der markierten Proben im kontinuierlichen Fluss nur das reine Fluoreszenzsignal ohne Versatz (Offset) detektiert wird.

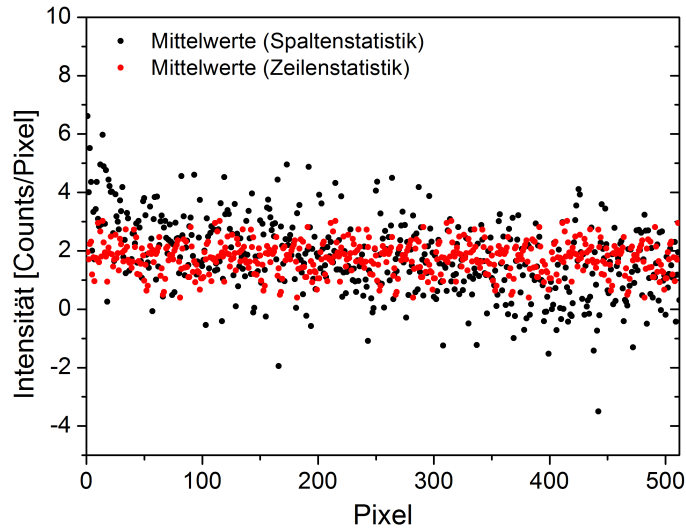
In Abb. 4.1 ist zur besseren Übersicht nur die Auftragung der Mittelwerte (anstatt aller Pixel) einer solchen Hintergrundmessung als Beispiel zu sehen. Die schwarzen Punkte geben die Mittelwerte der Intensität der Spalten, die roten Punkte die Mittelwerte der Intensität der Zeilen des gesamten CCD-Chips ( $512 \times 512$  Pixel) an. Beide Statistiken stimmen überein, was auf eine gleichmäßige Ausleuchtung des CCD-Chips hindeutet. Aus den Mittelwerten der Pixel-Zeilen und -Spalten berechnet sich eine Standardabweichung von 2 Counts/Pixel. Hier handelt es sich aber um ein geglättetes Signal, das nur aus Gründen der übersichtlicheren Anschauung dargestellt ist (anstatt einer Auftragung über alle Pixel). Die Standardabweichung gemittelt über alle Pixel liegt bei 11 Counts/Pixel.

Das LOD berechnet sich also zu

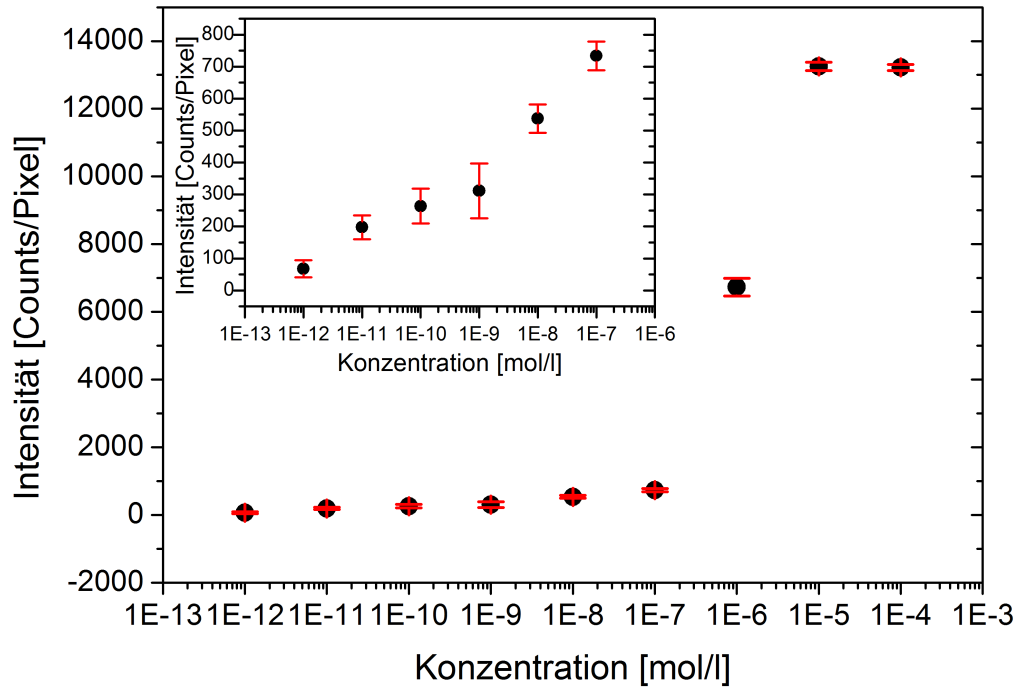
$$2 \frac{\text{Counts}}{\text{Pixel}} + 3 \cdot 11 \frac{\text{Counts}}{\text{Pixel}} = 35 \frac{\text{Counts}}{\text{Pixel}}. \quad (4.2)$$

Das heißt, Intensitäten größer als 35 Counts/Pixel sind notwendig, um ein Signal eindeutig vom Hintergrund unterscheiden zu können.

## 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.1.:** Messung des Hintergrundes des Kamerachips. Jeder Punkt gibt den Mittelwert der Intensität für die jeweilige Pixel-Spalte (schwarz) bzw. Pixel-Zeile (rot) des CCD-Chips an.



**Abbildung 4.2.:** Empfindlichkeit des Detektionssystems. Auftragung des Fluoreszenzsignals gegen den Logarithmus der GFP-Konzentration. Im kleinen Fenster ist der Bereich der niedrigen Konzentrationen vergrößert dargestellt.

Um die untere Nachweisgrenze des Detektionssystems experimentell zu bestimmen, wurde eine Konzentrationsreihe im Trennkanal gemessen. Aus Kostengründen und aufgrund der schnelleren und einfacheren Durchführung (innerhalb weniger

## 4.2. Parameter der isoelektrischen Fokussierung im $\mu$ FFE-Chip

Stunden, um die Validität der Messung zu gewährleisten) wurde dafür GFP verwendet. Der Trennkanal wurde mit GFP-Lösungen (Konzentrationen von  $c = 10^{-12}$  mol/l bis  $c = 10^{-4}$  mol/l) komplett geflutet und jeweils die gemittelte Anzahl der Counts und deren Standardabweichung im Beobachtungsbereich der Kamera bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.2 dargestellt. Diese zeigt die Auftragung des Fluoreszenzsignals gegen den Logarithmus der GFP-Konzentration. Das Plateau bei den Werten  $c = 10^{-5}$  mol/l und  $c = 10^{-4}$  mol/l deutet auf die Sättigung des CCD-Chips hin, der in Übereinstimmung mit den Herstellerangaben bei 14.000 Counts liegt.

In Richtung geringerer Konzentrationen nimmt die Intensität ab einem Wert unter  $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l mit einer Intensität von 13252 Counts/Pixel rapide ab. Bei  $c = 1 \cdot 10^{-7}$  mol/l sind es nur noch 734 Counts/Pixel bis hin zu 68 Counts/Pixel bei  $c = 1 \cdot 10^{-12}$  mol/l. Testmessungen bestätigen die Theorie des LOD. Peak-Intensitäten von nur 30-40 Counts/Pixel Fluoreszenz-Signal von gelabelten Substanzen können eindeutig identifiziert werden.

Die Ergebnisse lassen sich auf die Detektion von gelabeltem Anti-IgG, das im Folgenden Bestandteil des Immunoassays ist, übertragen. Messungen zeigen, dass bei der verwendeten Konzentration  $c = 10^{-8}$  mol/l von Anti-IgG die Fluoreszenzintensität im gleichen Bereich liegt, wie bei der gleichen Konzentration der GFP-Lösung.

## 4.2. Parameter der isoelektrischen Fokussierung im $\mu$ FFE-Chip

Für jede isoelektrische Fokussierung ist die Linearität des pH-Gradienten eine notwendige Voraussetzung. Um diese zu prüfen, wurden niedermolekulare IEF-Marker (isoelectric focusing markers) eingesetzt, die im Gegensatz zu gängigen Protein-Standards wegen ihrer besseren Löslichkeit eine niedrigere Ausfällungstendenz am isoelektrischen Punkt zeigen [26]. IEF-Marker sind Peptide, Enzyme oder Aminosäuren mit exakt definiertem pI. Ein IEF-Marker gibt den theoretischen pI-Wert an bzw. zeigt lokal aufgelöst den pH-Wert im Trennkanal. Sie werden genutzt, um IEF-Systeme zu charakterisieren.

Um mit dem in dieser Arbeit konzipierten Chip elektrophoretische Trennungen durchführen zu können, benötigt jede zu trennende Probe spezielle Flussraten und Spannungswerte. Unterschiedliche Flussraten bedeuten eine veränderte Ausdehnung des pH-Gradienten. Eine allgemeine Charakterisierung des pH-Gradienten im hier gezeigten  $\mu$ FFE-Chip ist deshalb nicht möglich. Die Messungen mit den IEF-Markern können lediglich die Existenz eines linearen pH-Gradienten zeigen, jedoch keine universell gültige Charakterisierung dieses  $\mu$ FFE Chips.

Die verwendeten Ampholytlösungen und pI-Marker zur Bestimmung der Parameter der  $\mu$ FFE-Chips wurden in Abstimmung auf die untersuchten biologischen Systeme ausgewählt. Das verwendete Ampholytsystem besteht aus amphoteren Sub-

## 4. Ergebnisse und Diskussion

stanzen mit gleichen Differenzen der isoelektrischen Punkte über den gesamten pH-Bereich pH 3-10 bzw. pH 6-9. Nimmt man an, dass alle IEF-Marker exakt bei Ihrem pI fokussieren, erwartet man einen linearen pH-Gradienten. Da für die IEF der Proteine, ssDNA und Immunglobuline Ampholytlösungen sowohl im pH-Bereich 6-9 als auch im pH-Bereich 3-10 eingesetzt wurden, werden diese Bereiche bei der folgenden Parameteruntersuchung der IEF betrachtet.

Die pI-Werte der in dieser Arbeit verwendeten IEF-Marker liegen bei 6,2, 7,6, 8,7 und 10,3 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf). Um einen möglichst breiten Bereich von pH-Werten abzudecken, wurde jeweils zusätzlich in einer separaten Messung Methylrot (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) isoelektrisch fokussiert, welches einen pI von 4,0 aufweist.

Bei der experimentellen Untersuchung der Linearität des pH-Gradienten im pH-Bereich pH 3-10 und pH 6-9 fand die Versorgung des  $\mu$ FFE-Chips wie in Abb. 3.7 dargestellt statt. Die Elektrodenkanäle wurden auf der Seite der Anode mit 100 mM Phosphorsäurelösung und auf der Seite der Kathode mit 50 mM Natriumhydroxidlösung versorgt. Als anodaler Stabilisierungspuffer wurde eine 100 mM Phosphorsäurelösung mit 0,1 % Tween 20 und 0,2 % HPMC und als kathodaler Stabilisierungspuffer eine 50 mM Natriumhydroxidlösung mit 0,1 % Tween 20 und 0,2 % HPMC verwendet. Das Trennmedium bestand aus einer 2 %igen Träger-Ampholytlösung mit 0,1 % Tween 20 und 0,2 % HPMC. Alle verwendeten Lösungen wurden vor jeder Messung für 30 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Bei der Untersuchung des pH-Gradienten im Bereich pH 3-10 im Teilkapitel „Parameter der  $\mu$ FFE im Bereich pH 3-10“ fand zunächst die IEF der vier IEF-Marker (Konzentration 0,5 mg/ml) statt. In einer zweiten Messung erfolgte die IEF des pH-Indikators Methylrot (pI = pH 4, Konzentration von 1 mg/ml). Beide Messungen wurden jeweils in drei  $\mu$ FFE-Chips durchgeführt.

Im darauf folgenden Teilkapitel „Parameter der  $\mu$ FFE im Bereich pH 6-9“ wird die Untersuchung der Linearität des pH-Gradienten im Bereich pH 6-9 mittels der IEF-Marker mit den pI-Werten 6,2, 7,6 und 8,7 untersucht. Auch hier wurden die Messungen in drei  $\mu$ FFE-Chips durchgeführt.

Als Parameter für die Beschreibung der Trennqualität eines Separationssystems mit Gleichgewichtsgradient wie dem IEF-System haben sich die Standardabweichung  $\sigma$  der Bandbreite der Fluoreszenz, die Auflösung der IEF  $\Delta(pI)_{min}$  und die Peak-Kapazität  $n$  des  $\mu$ FFE-Chips als sinnvoll herausgestellt[39]. Bei Annahme einer Gauß'schen Konzentrationsverteilung ergibt sich für die Standardabweichung eines durch IEF hervorgerufenen Peaks

$$\sigma = \sqrt{\frac{D}{pE}}. \quad (4.3)$$

Dabei stellt  $E$  die elektrische Feldstärke,  $D$  den Diffusionskoeffizienten und  $p$  das Produkt aus der negativen Steigung der elektrophoretischen Mobilität des Analyten

## 4.2. Parameter der isoelektrischen Fokussierung im $\mu$ FFE-Chip

$\frac{d\mu}{d(pH)}$  und der Steigung des pH-Gradienten  $\frac{d(pH)}{dx}$  dar.

$$p = -\frac{d\mu}{d(pH)} \cdot \frac{d(pH)}{dx} \quad (4.4)$$

Die Auflösung  $\Delta pI_{min}$  beschreibt die minimale pI Differenz für zwei aufgetrennte Substanzen und nimmt einen minimalen Abstand zweier separierter Peaks von  $3\sigma$  an.

$$\Delta pI_{min} = \frac{d(pH)}{dx} 3\bar{\sigma}. \quad (4.5)$$

Ein anderer wichtiger Parameter zur Beschreibung der Trennqualität ist die Peakkapazität  $n$  gegeben durch

$$n = \frac{L}{4\bar{\sigma}}, \quad (4.6)$$

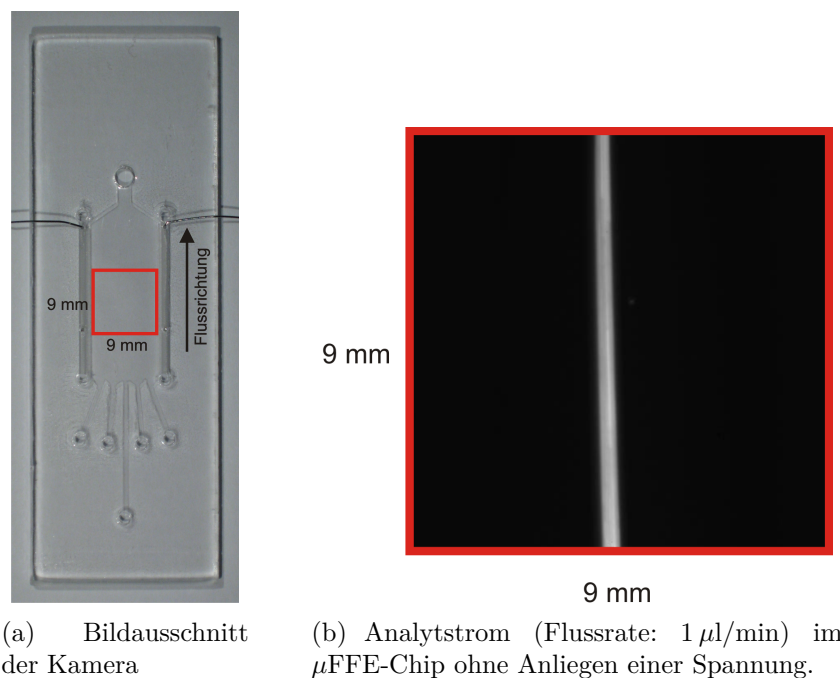
wobei  $L$  die Gesamtlänge des pH-Gradienten im Chip beschreibt.

Die Standardabweichung der Peakbreite  $\sigma$  wird durch Anpassung der Peaks unter der Annahme einer Gauß'schen Konzentrationsverteilung berechnet. Die Peakbreite entspricht demnach einem Wert von  $2\sigma$ .

Die in den folgenden Abschnitten dargestellten Aufnahmen zeigen alle den in Abb. 4.3(a) markierten Bereich im  $\mu$ FFE Chip mit den Abmessungen  $9\text{ mm} \times 9\text{ mm}$ . Der Kamerachip hat eine Größe von  $512 \times 512$  Pixel und demnach eine Auflösung von  $0,0175\text{ mm}$ . Der Fluss verläuft von unten nach oben; die Fließgeschwindigkeiten sind im Text angegeben.

Liegt noch keine Spannung an den Elektroden an, fließt der Analytstrom unbeeinflusst in der Mitte des Trennkanals, wie in Abb. 4.3(b) dargestellt. Solange keine Spannung anliegt, vermischen sich benachbarte Strömungen nicht und verlaufen weitestgehend unbeeinflusst. Sie unterliegen nur der Diffusion als Mischungsprozess.

## 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.3.:** Bildausschnitt der Kamera mit den Abmessungen 9 mm x 9 mm (a) und Beispiel für den Analytstromfluss im µFFE Chip ohne Anlegen einer Spannung (b)

### Parameter der µFFE im Bereich pH 3-10

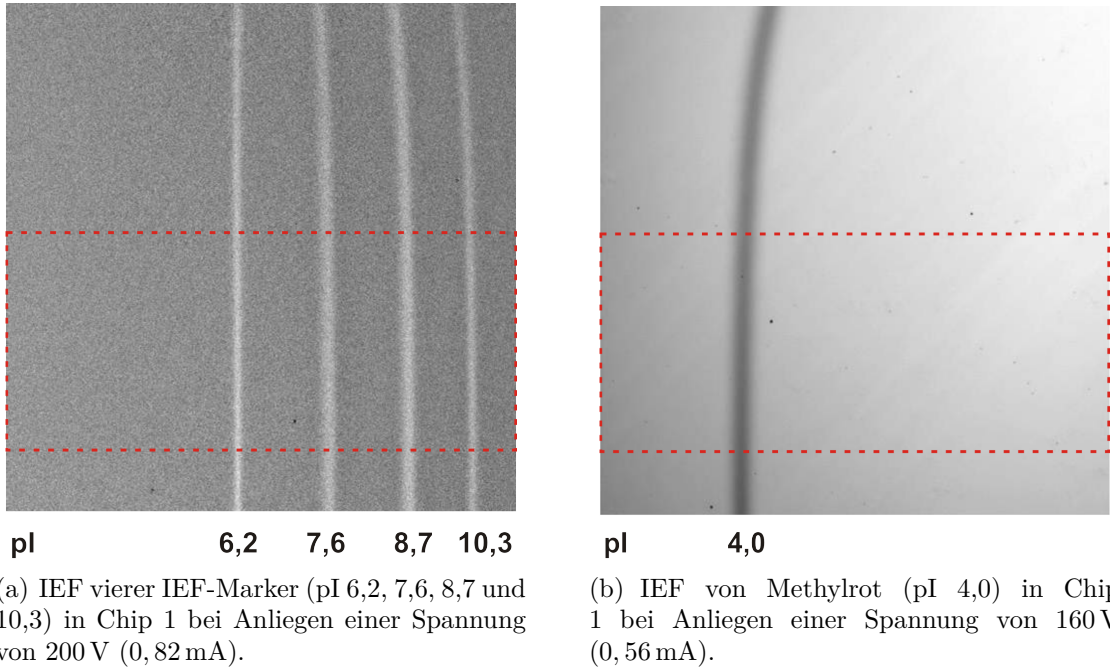
#### Ergebnisse für Chip 1

Abb. 4.4 zeigt zwei Aufnahmen der FFIEF in Chip 1. In Abb. 4.4(a) ist die Auftrennung der vier verwendeten IEF-Marker bei Anlegen einer Spannung von 22 Vmm<sup>-1</sup> (Spannung  $U = 200$  V, Stromstärke  $I = 0,82$  mA) und in Abb. 4.4(b) die Auftrennung von Methylrot bei Anlegen einer Spannung von 18 Vmm<sup>-1</sup> (Spannung  $U = 160$  V, Stromstärke  $I = 0,56$  mA) innerhalb weniger Sekunden zu sehen. Am oberen Bildrand ist eine leichte Bogenbildung der fokussierten Marker zu erkennen, der auf die Absaugung der Flüssigkeiten im Chip zurückzuführen ist. Für die Erstellung der Elektropherogramme (graphische Darstellung der Resultate einer Elektrophorese-Analyse) wird dieser Bereich nicht berücksichtigt. Die Fließgeschwindigkeiten wurden für alle drei Chips im Trennraum mit 1,5 mm s<sup>-1</sup> und in den Elektrodenkanälen mit jeweils 0,35 mm s<sup>-1</sup> gemessen.

In Abb. 4.5(a) und 4.5(b) sind die Elektropherogramme der vier IEF-Marker und Methylrot dargestellt. Im Fall der IEF-Marker wurde die normierte Fluoreszenz gegen die Position  $x$  im µFFE-Chip aufgetragen und im Fall der Absorptionsmessung von Methylrot die normierte Intensität gegen die Position  $x$  im µFFE-Chip. Abb. 4.5(c) und 4.5(d) zeigen die gleichen Graphiken mit den entsprechenden Anpassungen unter der Annahme einer Gauß'schen Konzentrationsverteilung. Alle Kurven



## 4.2. Parameter der isoelektrischen Fokussierung im $\mu$ FFE-Chip



**Abbildung 4.4.:** IEF der vier IEF-Marker (a) und des pH-Indikators Methylrot (b) in Chip 1. Der für die Auswertung berücksichtigte Bereich ist rot markiert.

wurden mit der Funktion

$$I = I_0 + A \cdot \exp\left(-2 \left(\frac{x - x_0}{2\sigma}\right)^2\right) \quad (4.7)$$

angepasst.  $I$  beschreibt die gemessene Intensität,  $I_0$  den Offset,  $A$  die Amplitude des Peaks,  $x_0$  den  $x$ -Wert der Peakposition und  $\sigma$  die Standardabweichung des Peaks.

Anfangs- und Endpunkt der angegebene pH-Werte-Skala ergeben sich aus der Ausdehnung des Stabilisierungspuffers im Chip. Dieser wiederum definiert die Ausdehnung der Ampholytlösung im Trennkanal, da er sie von beiden Seiten einschließt. Die Skala selbst bezieht sich auf die Spezifikation der verwendeten Ampholytlösung (pH-Bereich 3-10 bzw. 6-9).

Die Ausdehnung des Stabilisierungspuffers wurde nach jeder Messung mit den in der jeweiligen Messung eingestellten Flussraten gemessen. Dazu wurden die Einlässe der Stabilisierungspuffer mit einer Fluoreszenzfarbstoff-Lösung, die den Stabilisierungspufferbereich sichtbar werden lässt, versorgt.

Alle Experimente, Auftragungen und Berechnungen wurden in jedem Chip gleichermaßen durchgeführt.

Die Ergebnisse für Chip 1, Peakpositionen  $x$ , Peakbreiten  $\omega$  und Standardabweichungen  $\sigma$  der Peaks sind in der Tabelle 4.1 aufgeführt. In Abb.4.6 sind zusammenfassend die Ergebnisse für Chip 1 graphisch dargestellt. Abb. 4.6 A zeigt die Fluoreszenzmessung der IEF-Marker bzw. die Absorptionmessung von Methylrot

## 4. Ergebnisse und Diskussion

während der IEF. Um die Linearität des pH-Gradienten zu überprüfen, wurde die Fluoreszenzintensität resultierend aus der IEF-Messung der Marker und Methylrot aufgetragen. Zusätzlich zum Elektropherogramm der IEF-Marker wurde der Peak von Methylrot in die Graphik eingebunden (Abb. 4.6 B). Anhand der Peakpositionen erhält man den experimentell interpolierten pH-Gradienten, wie in Abb. 4.6 C dargestellt. Die Skala der x-Achse in Abb. 4.6 C gilt auch für Abb. 4.6 B und Abb. 4.6 A. Der pH-Gradient ist vollständig ausgebildet und nahezu linear.

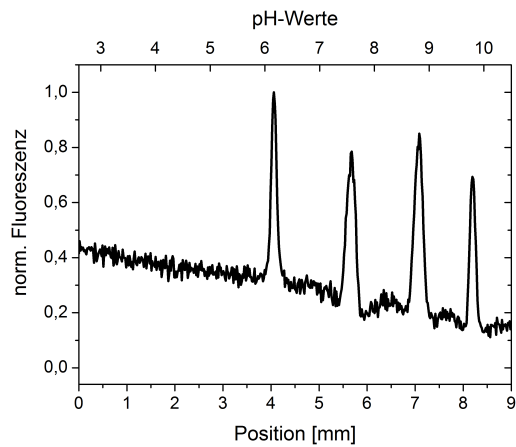
Desweiteren wird ein erwarteter pH-Gradient aufgeführt, der den aufgrund der Spezifikationen der Ampholytlösung erwarteten Verlauf des pH-Gradienten angibt, also die Situation einer gleichmäßigen Ausrichtung der Ampholyte im Trennmedium darstellt. Dieser ergibt sich aus der Länge der Strecke  $L$ , die vom Trennmedium eingenommen wird.  $L$  ist abhängig von der Ausdehnung des Stabilisierungspuffers, der das Trennmedium von beiden Seiten einschließt.

Für Chip 1 erstreckt sich  $L$  von  $x = 0,5$  bis  $x = 8,5$  im pH-Bereich 3-10. Verbindet man Anfangs- und Endpunkt der Strecke  $L$ , erhält man den erwarteten pH-Gradienten. An dieser Stelle ist nur die Strecke  $L$  für die Messung mit den IEF-Markern berücksichtigt worden, nicht aber die Strecke  $L$  für die Messung mit Methylrot. Der in Abb. 4.6 C dargestellte gemessene pH-Gradient entspricht näherungsweise dem erwarteten pH-Gradienten. Die Steigung des erwarteten pH-Gradienten beträgt 0,86 und die des gemessenen pH-Gradienten 1,0. Die Abweichung des gemessenen vom erwarteten pH-Gradienten wird vor allem durch die Peakposition von Methylrot (pI 4,0) bedingt. Da sich aufgrund des breiteren Stabilisierungspufferbereiches bei der IEF von Methylrot der pH-Gradient im Kanal auf einer kürzeren Strecke  $L$  ausbreitet als es bei der IEF der IEF-Marker der Fall ist, verschiebt sich der Peak von Methylrot um ca. 1 mm nach rechts. Das erklärt die Abweichung von  $x_{\text{gemessen}}$  zu  $x_{\text{erwartet}}$ .

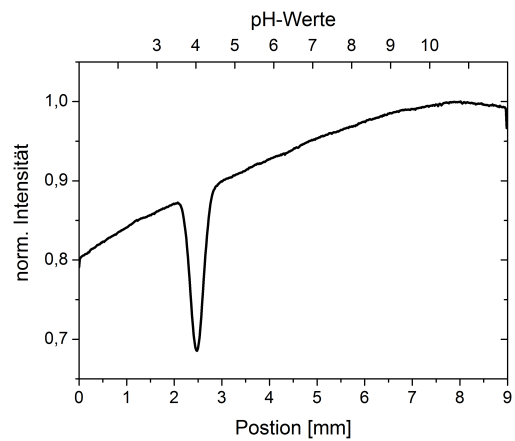
pI Methylrot/IEF-Marker	$x$ [mm] erwartet	$x$ [mm] gemessen	$\omega$ [mm]	$\sigma$ [mm]
4,0	1,52	2,47	0,27	0,14
6,2	4,10	4,06	0,11	0,06
7,6	5,70	5,66	0,18	0,09
8,7	6,92	7,07	0,17	0,09
10,3	8,37	8,19	0,11	0,06

**Tabelle 4.1.:** Ergebnisse für erwartete und gemessene Peakpositionen  $x$ , Peakbreiten  $\omega$  und Standardabweichungen  $\sigma$  der Peaks der IEF-Marker und Methylrot für Chip 1.

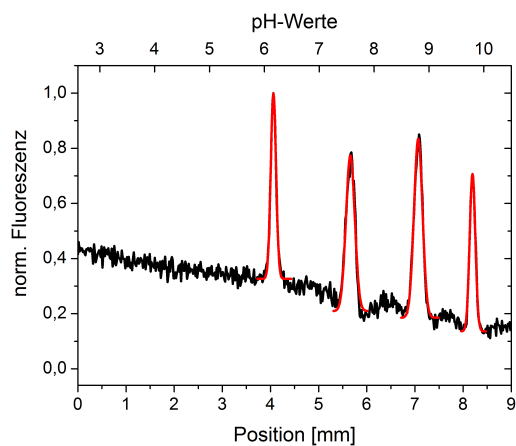
## 4.2. Parameter der isoelektrischen Fokussierung im $\mu$ FFE-Chip



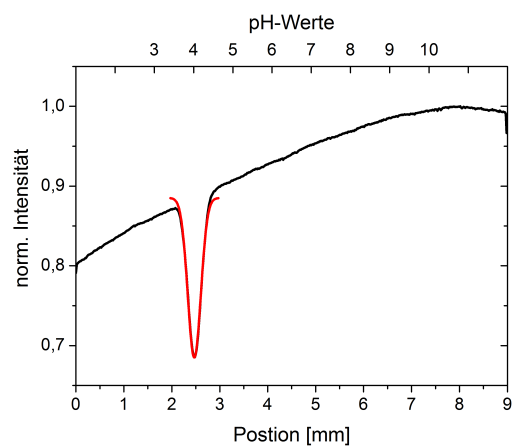
(a) Elektropherogramm der IEF-Marker



(b) Elektropherogramm von Methylrot



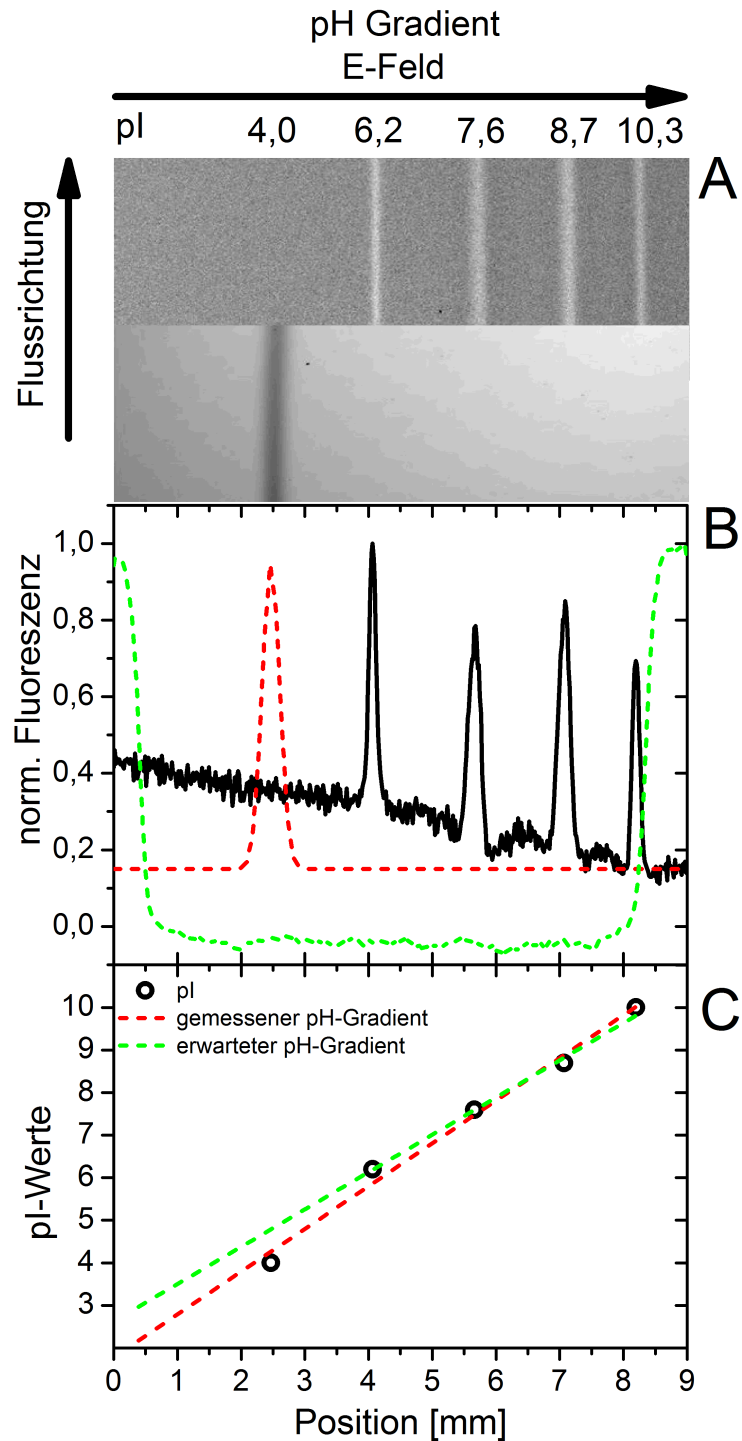
(c) Anpassung (rote Kurven) der Fluoreszenzpeaks der IEF-Marker (schwarze Kurve)



(d) Anpassung (rote Kurve) des Absorptionspeaks von Methylrot (schwarze Kurve)

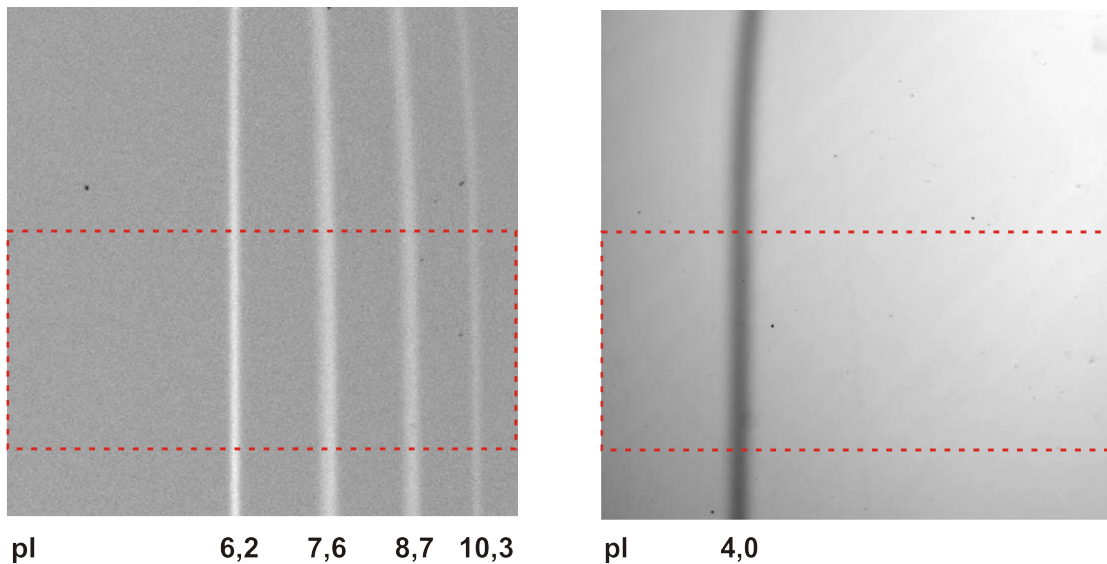
**Abbildung 4.5.:** Messung der IEF von IEF-Markern und Methylrot in Chip 1. Normierte Fluoreszenzen der IEF-Marker (a), Absorptionskurve der IEF von Methylrot (b), Anpassung der Fluoreszenzpeaks der IEF-Marker (c) und Anpassung des Absorptionspeaks von Methylrot (d).

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.6.:** Ausbildung des pH-Gradienten mit IEF-Markern und Methylrot in Chip 1. A: IEF-Marker und Methylrot fokussieren während der IEF. B: Elektropherogramm (Position in Abhängigkeit der norm. Fluoreszenz) der IEF-Marker (schwarze Kurve) und Methylrot (rote gestrichelte Kurve) sowie die Ausdehnung des Stabilisierungspuffers (grüne gestrichelte Kurve). C: Auftragung der Peak-Position in Abhängigkeit der pI-Werte mit gemessenem und erwartetem pH-Gradienten.

## Ergebnisse für Chip 2



(a) IEF vierer IEF-Marker (pI 6,2; 7,6; 8,7 und 10,3) in Chip 2 bei Anlegen einer Spannung von 210 V (0,74 mA).

(b) IEF von Methylrot (pI 4,0) in Chip 2 bei Anlegen einer Spannung von 160 V (0,66 mA).

**Abbildung 4.7.:** IEF der vier IEF-Marker (a) und des pH-Indikators Methylrot (b) in Chip 2. Der für die Auswertung berücksichtigte Bereich ist rot markiert.

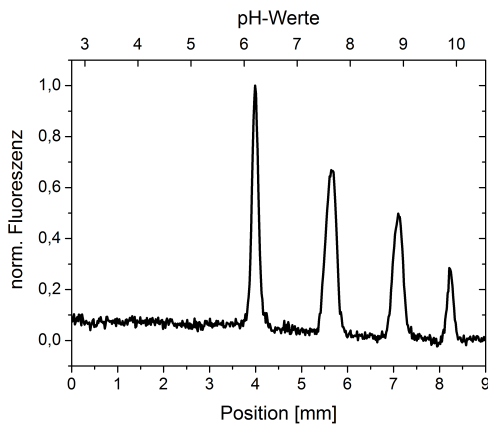
In Abb. 4.7 sind zwei Aufnahmen der FFIEF in Chip 2 zu sehen. Abb. 4.7(a) zeigt die Auftrennung der vier verwendeten IEF-Marker beim Anlegen einer Spannung von  $23 \text{ Vmm}^{-1}$  (Spannung  $U = 210 \text{ V}$ , Stromstärke  $I = 0,74 \text{ mA}$ ). In Abb. 4.7(b) wird die Auftrennung von Methylrot bei Anlegen einer Spannung von  $18 \text{ Vmm}^{-1}$  (Spannung  $U = 160 \text{ V}$ , Stromstärke  $I = 0,66 \text{ mA}$ ) innerhalb weniger Sekunden dargestellt. In Abb. 4.8(a) und 4.8(b) sind, wie zuvor für Chip 1, die Elektropherogramme der vier IEF-Marker und Methylrot für Chip 2 aufgeführt. Abb. 4.8(c) und 4.8(d) zeigen die entsprechenden Anpassungen.

Die Ergebnisse für Chip 2 sind in der Tabelle 4.2 aufgeführt. Wie schon zuvor für Chip 1 gezeigt, erhält man anhand der Peakpositionen den experimentell interpolierten pH-Gradienten, wie in Abb. 4.9 C dargestellt. Der pH-Gradient ist, wie bei Chip 1, vollständig ausgebildet und nahezu linear. Gemessener und erwarteter pH-Gradient haben nahezu den gleichen Verlauf. Wieder ist die größte Abweichung bei der Peakposition von Methylrot zu finden, die auch hier um fast 1 mm von der erwarteten x-Position abweicht.

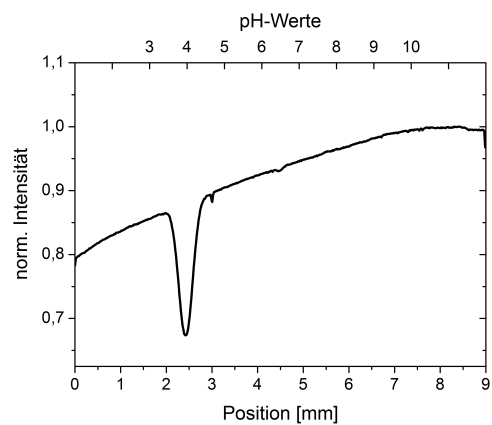
## 4. Ergebnisse und Diskussion

pI Methylrot/IEF-Marker	$x$ [mm] erwartet	$x$ [mm] gemessen	$\omega$ [mm]	$\sigma$ [mm]
4,0	1,43	2,42	0,30	0,15
6,2	4,03	4,00	0,13	0,07
7,6	5,64	5,64	0,23	0,11
8,7	6,90	7,10	0,21	0,10
10,3	8,44	8,23	0,13	0,07

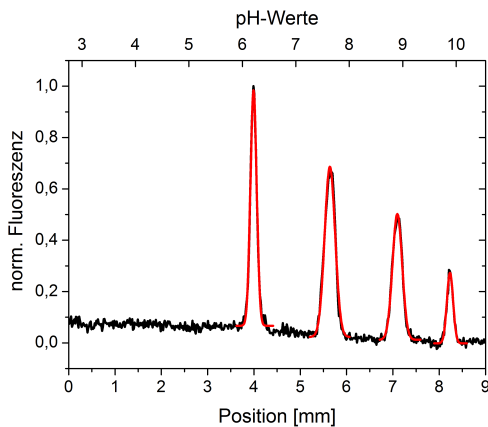
**Tabelle 4.2.:** Ergebnisse für erwartete und gemessene Peakpositionen  $x$ , Peakbreiten  $\omega$  und Standardabweichungen  $\sigma$  der Peaks der IEF-Marker und Methylrot für Chip 2.



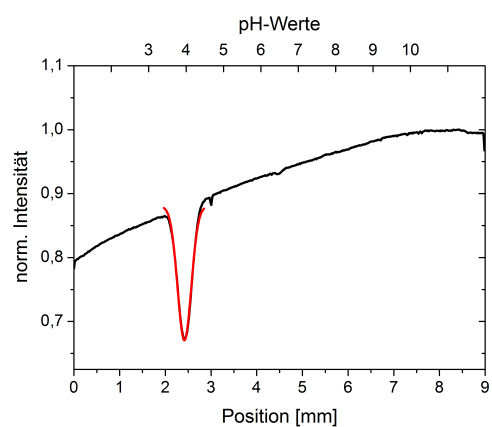
(a) Elektropherogramm der IEF-Marker



(b) Elektropherogramm von Methylrot



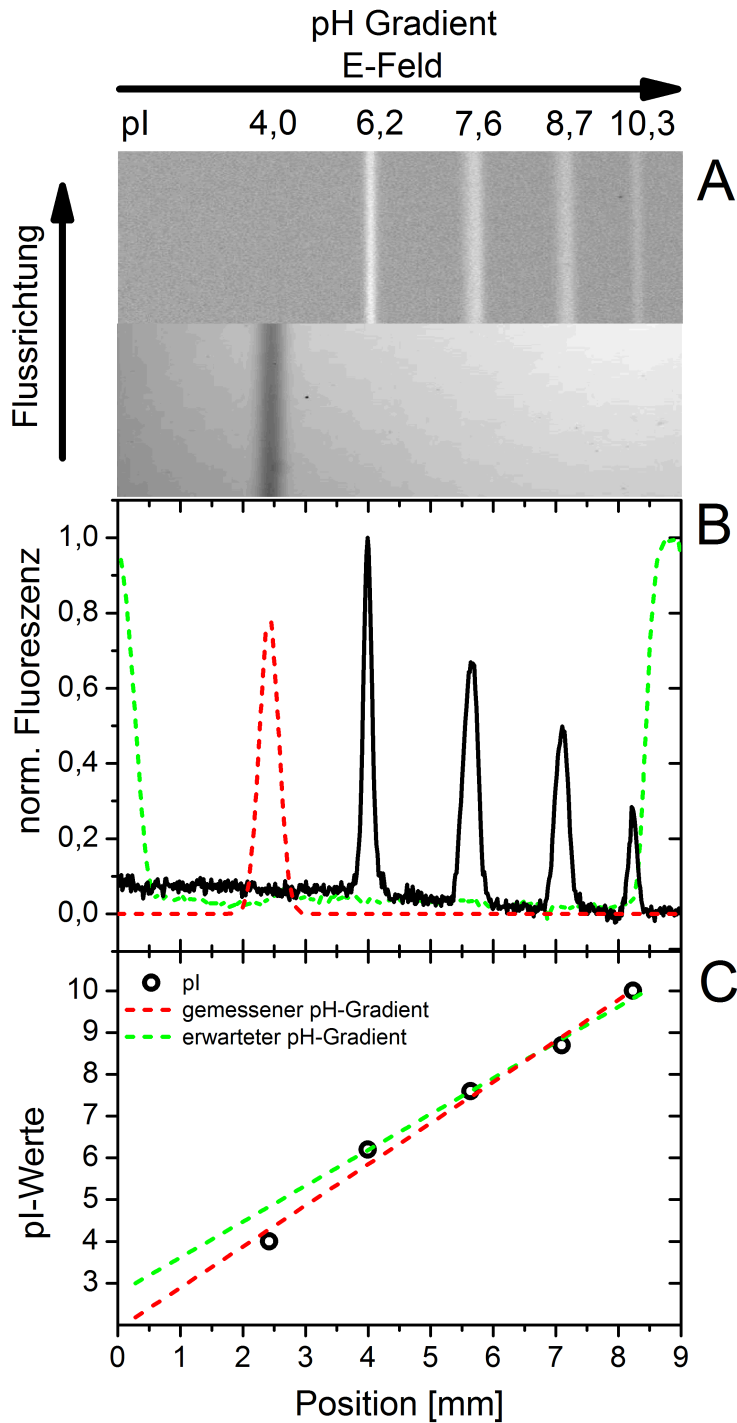
(c) Anpassung (rote Kurven) der Fluoreszenzpeaks der IEF-Marker (schwarze Kurve)



(d) Anpassung (rote Kurve) des Absorptionspeaks von Methylrot (schwarze Kurve)

**Abbildung 4.8.:** Messung der IEF von IEF-Markern und Methylrot in Chip 2. Normierte Fluoreszenzen der IEF-Marker (a), Absorptionskurve der IEF von Methylrot (b), Anpassung der Fluoreszenzpeaks der IEF-Marker (c) und Anpassung des Absorptionspeaks von Methylrot (d).

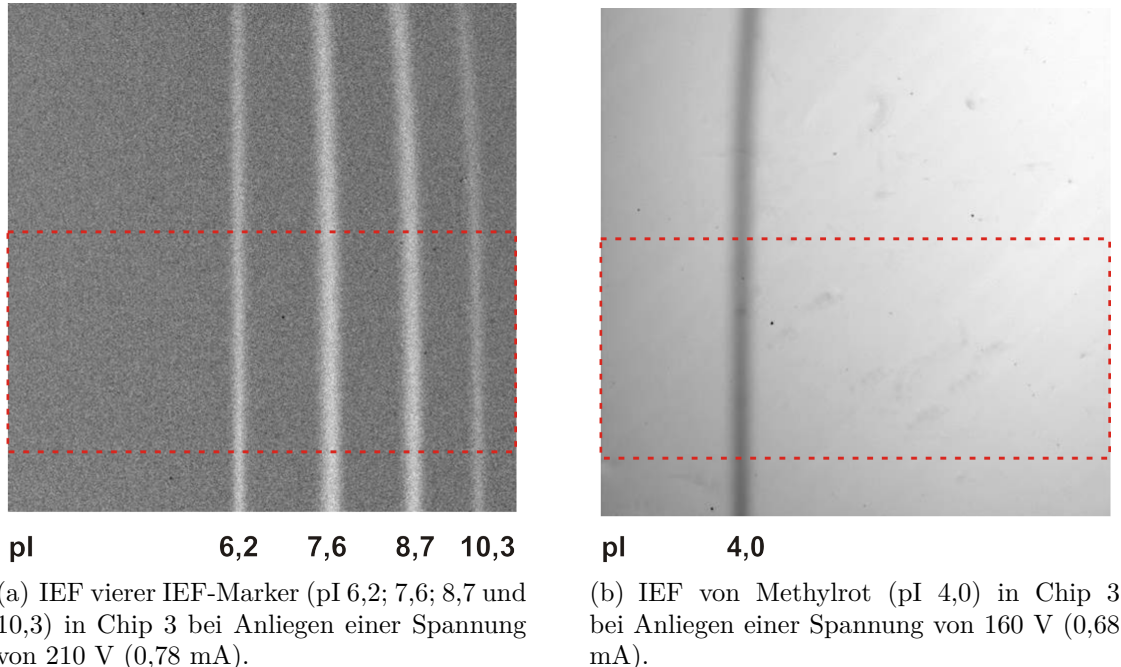
## 4.2. Parameter der isoelektrischen Fokussierung im $\mu$ FFE-Chip



**Abbildung 4.9.:** Ausbildung des pH-Gradienten mit IEF-Markern und Methylrot in Chip 2. A: IEF-Marker und Methylrot fokussieren während der IEF. B: Elektropherogramm (Position in Abhängigkeit der norm. Fluoreszenz) der IEF-Marker (schwarze Kurve) und Methylrot (rote gestrichelte Kurve) sowie die Ausdehnung des Stabilisierungspuffers (grüne gestrichelte Kurve). C: Auftragung der Peak-Position in Abhängigkeit der pI-Werte mit gemessenem und erwartetem pH-Gradienten.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### Ergebnisse für Chip 3



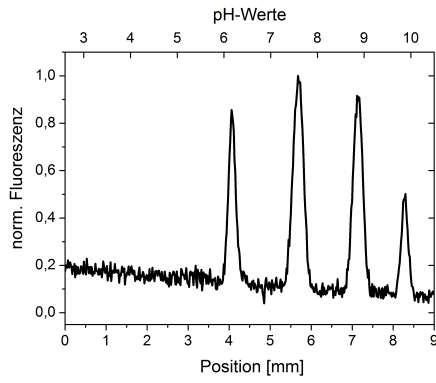
**Abbildung 4.10.:** IEF der vier IEF-Marker (a) und des pH-Indikators Methylrot (b) in Chip 3. Der für die Auswertung berücksichtigte Bereich ist rot markiert.

Abb. 4.10 zeigt zwei Aufnahmen der FFIEF in Chip 3. In Abb. 4.10(a) ist die Auftrennung der vier verwendeten IEF-Marker bei Anlegen einer Spannung von  $23\text{Vmm}^{-1}$  (Spannung  $U = 210\text{V}$ , Stromstärke  $I = 0,78\text{mA}$ ) dargestellt. In Abb. 4.10(b) ist die Auftrennung von Methylrot bei Anlegen einer Spannung von  $18\text{Vmm}^{-1}$  (Spannung  $U = 160\text{V}$ , Stromstärke  $I = 0,68\text{mA}$ ) innerhalb weniger Sekunden zu sehen. In Abb. 4.11(a) und 4.11(b) sind wie zuvor für Chip 1 und Chip 2 die Elektropherogramme der vier IEF-Marker und Methylrot für Chip 3 aufgeführt. Abb. 4.11(c) und 4.11(d) zeigen die gleichen Graphiken mit den entsprechenden Anpassungen.

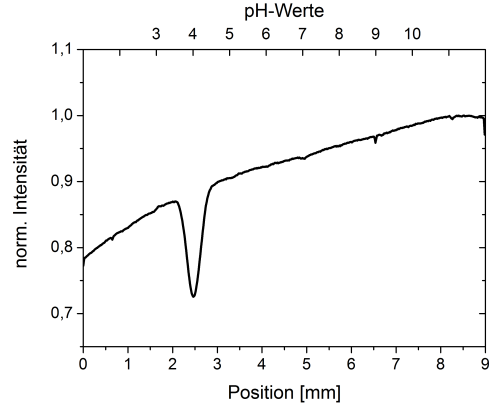
Die Ergebnisse für Chip 3 sind in der Tabelle 4.3 aufgeführt. Der pH-Gradient ist, wie bei Chip 1 und Chip 2, vollständig ausgebildet und nahezu linear (siehe Abb. 4.12 C). Auch bei dieser Messung beträgt die Abweichung der Peakposition von Methylrot fast 1 mm zu der erwarteten Position.



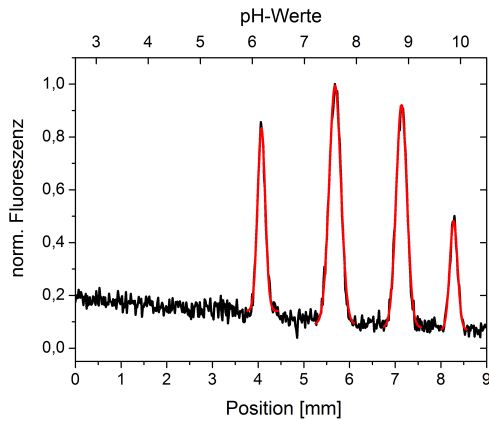
## 4.2. Parameter der isoelektrischen Fokussierung im $\mu$ FFE-Chip



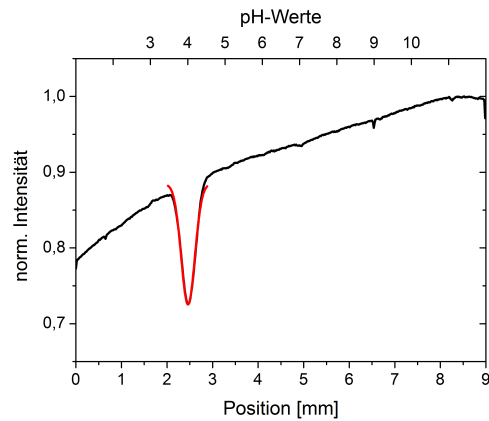
(a) Elektropherogramm der IEF-Marker



(b) Elektropherogramm von Methylrot



(c) Anpassung (rote Kurve) der Fluoreszenzpeaks (schwarze Kurve)



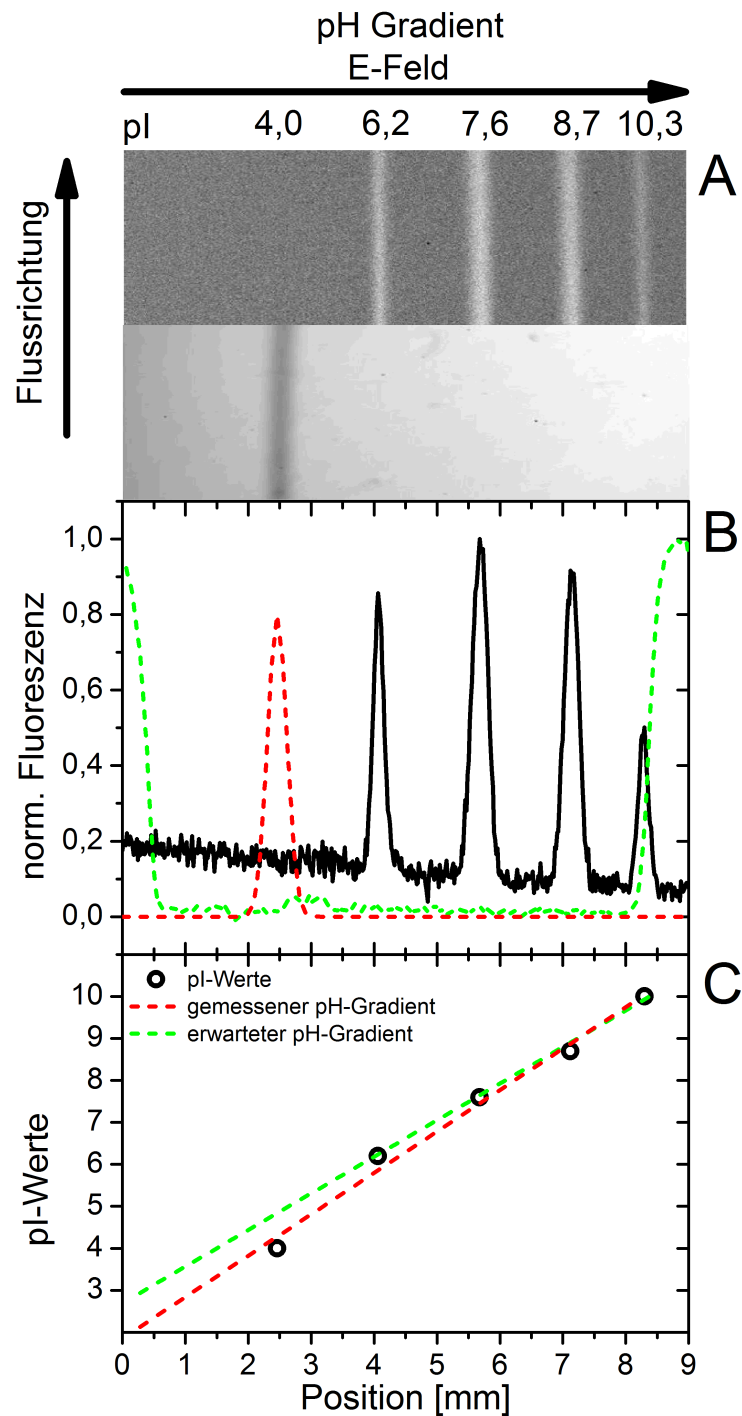
(d) Anpassung (rote Kurve) des Absorptionspeaks von Methylrot (schwarze Kurve)

**Abbildung 4.11.:** Messung der IEF von IEF-Markern und Methylrot in Chip 3. Normierte Fluoreszenzen der IEF-Marker (a), Absorptionskurve der IEF von Methylrot (b), Anpassung der Fluoreszenzpeaks der IEF-Marker (c) und Anpassung des Absorptionspeaks von Methylrot(d).

pI Methylrot/IEF-Marker	$x$ [mm] erwartet	$x$ [mm] gemessen	$\omega$ [mm]	$\sigma$ [mm]
4,0	1,51	2,46	0,30	0,15
6,2	4,04	4,07	0,17	0,09
7,6	5,60	5,68	0,25	0,13
8,7	6,90	7,14	0,23	0,12
10,3	8,38	8,28	0,17	0,08

**Tabelle 4.3.:** Ergebnisse für erwartete und gemessene Peakpositionen  $x$ , Peakbreiten  $\omega$  und Standardabweichungen  $\sigma$  der Peaks der IEF-Marker und Methylrot für Chip 3.

## 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.12.:** Ausbildung des pH-Gradienten mit IEF-Markern und Methylrot in Chip 3. A: IEF-Marker und Methylrot fokussieren während der IEF. B: Elektropherogramm (Position in Abhängigkeit der norm. Fluoreszenz) der IEF-Marker (schwarze Kurve) und Methylrot (rote gestrichelte Kurve) sowie die Ausdehnung des Stabilisierungspuffers (grüne gestrichelte Kurve). C: Auftragung der Peak-Position in Abhängigkeit der pI-Werte mit gemessenem und erwartetem pH-Gradienten.

Ergebnisse für Chip 1, Chip 2 und Chip 3 im pH-Bereich 3-10

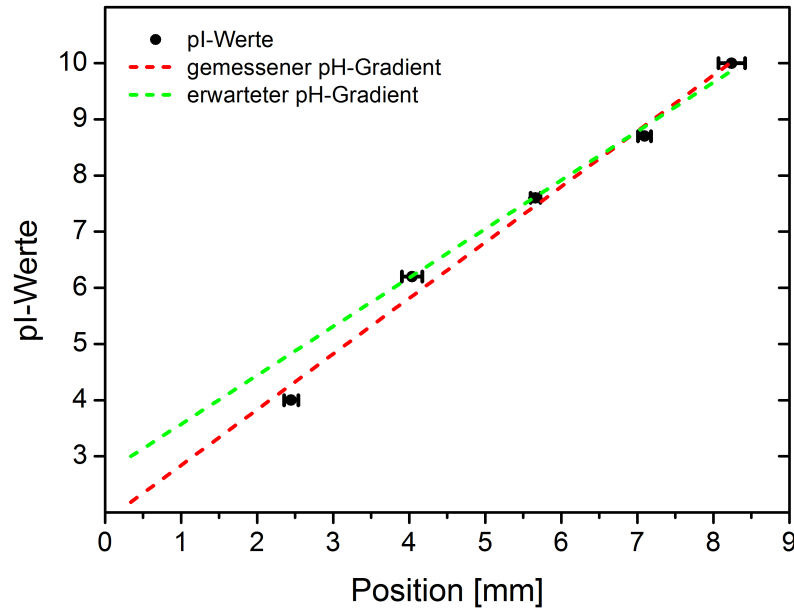


Abbildung 4.13.: Mittelwerte der pH-Gradienten aus den IEF-Messungen in Chip 1, Chip 2 und Chip 3 mit Fehlerbalken.

pI Methylrot/IEF-Marker	$x$ [mm] erwartet	$x$ [mm] gemessen	$\omega$ [mm]	$\sigma$ [mm]
4,0	1,48	2,45	0,29	0,15
6,2	4,00	4,04	0,14	0,07
7,6	5,63	5,66	0,22	0,11
8,7	6,93	7,10	0,21	0,10
10,3	8,40	8,24	0,14	0,07

Tabelle 4.4.: Mittelwerte für erwartete und gemessene Peakpositionen  $x$ , Peakbreiten  $\omega$  und Standardabweichungen  $\sigma$  der Peaks der IEF-Marker und Methylrot für Chip 1, Chip 2 und Chip 3.

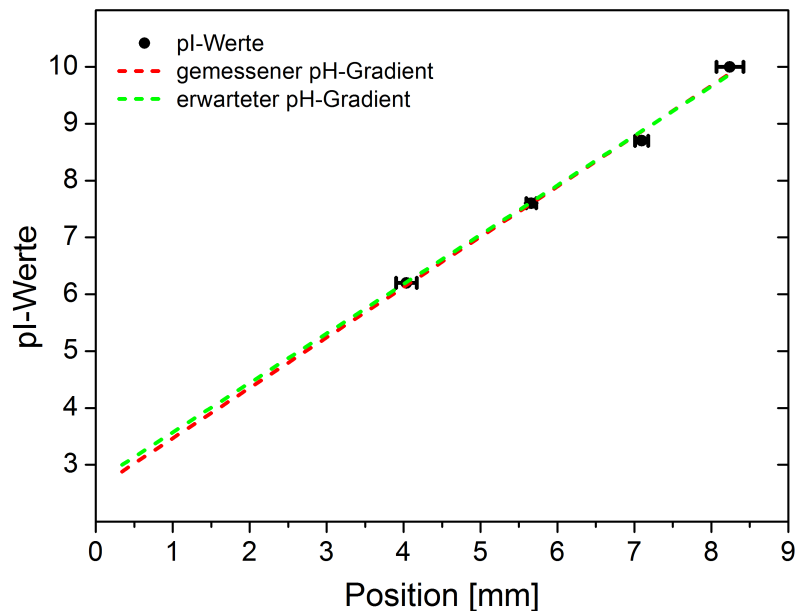
Aus Abbildung 4.13 lassen sich gemessener und erwarteter pH-Gradient als Mittelwert aus den drei vorangegangenen Messungen ablesen. Bei Betrachtung der erwarteten und der gemessenen Werte für die Peakpositionen  $x$  fällt die Abweichung von fast 1 mm für den pI-Marker 4,0 auf. Wie schon zuvor erwähnt, ergibt sich diese aufgrund der separaten IEF-Messung Methylrot mit anderen Einstellungen für Fließgeschwindigkeiten im Trenn- und Elektrodenraum und anderen Spannungen und der damit verbundenen geringeren Strecke  $L$ , über die sich der pH-Gradient erstreckt. Die Steigung des gemessenen pH-Gradienten beträgt  $m = 0,99$ , die des

## 4. Ergebnisse und Diskussion

erwarteten pH-Gradienten  $m = 0,87$ . Aufgrund der separaten Messung und der systematischen Abweichung der Messwerte von Methylrot werden diese Messwerte für die Berechnung der Parameter des  $\mu$ FFE-Chips vernachlässigt. Abb. 4.14 zeigt den gemessenen und den erwarteten pH-Gradienten ohne Berücksichtigung des Messwertes von Methylrot. Die beiden Gradienten haben bis auf eine minimale Abweichung ( $m_{\text{pH(gemessen)}} = 0,89$  und  $m_{\text{pH(erwartet)}} = 0,87$ ) denselben Verlauf.

In Tabelle 4.4 sind die Mittelwerte für Standardabweichung, Auflösung und Peak-Kapazität angegeben. Entsprechend der Gleichungen 4.5 und 4.6 berechnen sich die Auflösung  $\Delta(pI)_{\min}$  und Peak-Kapazität  $n$  mit den Werten  $d(\text{pH}) = 7$  (da sich der pH-Bereich von pH 3-10 erstreckt) und  $L = 8,06$  mm (Mittelwert der Ausdehnung des Trennmediums und damit des pH-Gradienten zwischen dem Stabilisierungspuffer der drei verwendeten Chips).

Für den pH-Bereich 3-10 ergeben sich für die mittlere Standardabweichung der Peaks  $\sigma = 0,09$  mm, für die Auflösung  $\Delta(pI)_{\min} = 0,23$  pH-Einheiten und für die Peak-Kapazität  $n = 22$  Peaks (siehe Tabelle 4.5). *Kohlheyer et al.* publizierte die Werte  $n = 18$  Peaks und  $\Delta(pI)_{\min} = 0,7$  pH-Einheiten und in einer späteren Veröffentlichung  $n = 29$  Peaks und  $\Delta(pI)_{\min} = 0,23$  pH – Einheiten [33]. Die Größenordnung der Werte entspricht der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse.



**Abbildung 4.14.:** Ergebnis der pH-Gradienten aus den IEF-Messungen in Chip 1, Chip 2 und Chip 3 mit Fehlerbalken unter Vernachlässigung der Messwerte von Methylrot.

## 4.2. Parameter der isoelektrischen Fokussierung im $\mu$ FFE-Chip

$\bar{\sigma}$ [mm]	$\Delta(pI)_{min}$ [pH-Einheiten]	Peak-Kapazität $n$ [Peaks]
$0,09 \pm 0,02$	0,23	22

Tabelle 4.5.: Parameter der  $\mu$ FFE für den pH-Bereich 3-10.

### Parameter der $\mu$ FFE im Bereich pH 6-9

#### Ergebnisse für Chip 1

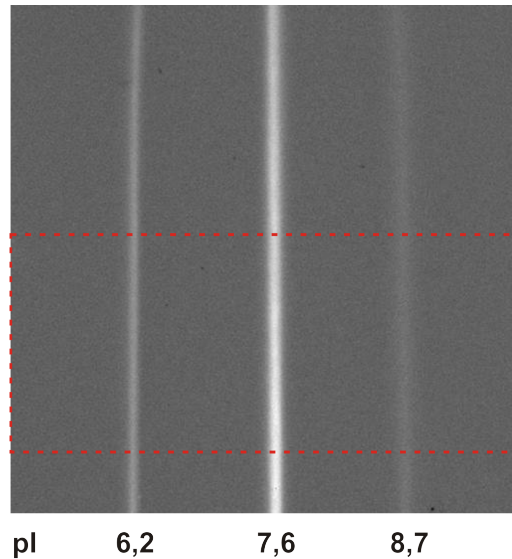


Abbildung 4.15.: IEF dreier IEF-Marker (pI 6,2; 7,6 und 8,7) in Chip 1 bei Anlegen einer Spannung von 200 V (0,75 mA). Der für die Auswertung berücksichtigte Bereich ist rot markiert.

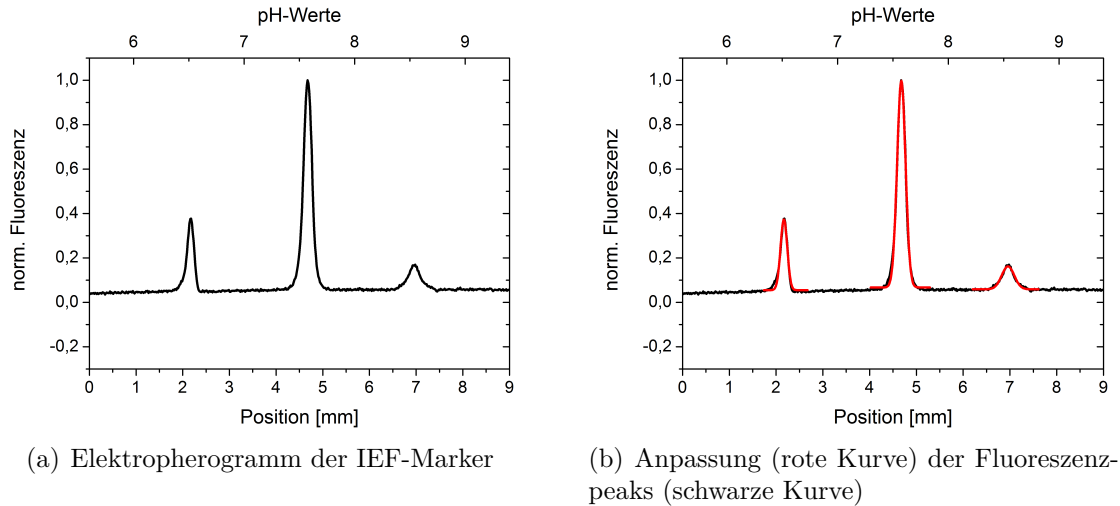
Abb. 4.15 zeigt die Aufnahme der FFIEF in Chip 1. Bei Anlegen einer Spannung von  $22 \text{ Vmm}^{-1}$  (Spannung  $U = 200 \text{ V}$ , Stromstärke  $I = 0,75 \text{ mA}$ ) werden die IEF-Marker innerhalb weniger Sekunden aufgetrennt.

In Abb. 4.16(a) ist das Elektropherogramm der drei IEF-Marker zu sehen. Dabei wurde die normierte Fluoreszenz gegen die Position im  $\mu$ FFE-Chip aufgetragen. In Abb. 4.16(b) ist die gleiche Auftragung mit entsprechender Kurvenanpassung unter der Annahme einer Gauß'schen Konzentrationsverteilung zu sehen.

Ergebnisse für Chip 1, Peakpositionen, Peakbreiten  $\omega$  und Standardabweichungen  $\sigma$  sind in der Tabelle 4.6 aufgeführt. Wie zuvor berechnet sich die Peakbreite  $\omega$  entsprechend der Gauß'schen Konzentrationsverteilung zu  $2\sigma$ .

Zur Überprüfung der Linearität dient die Auftragung der Fluoreszenzintensität, die aus der IEF-Messung der Marker resultiert. Wie anfangs erwähnt, erhält man anhand der Peakpositionen den experimentell interpolierten pH-Gradienten, wie in Abb. 4.17 dargestellt.

## 4. Ergebnisse und Diskussion



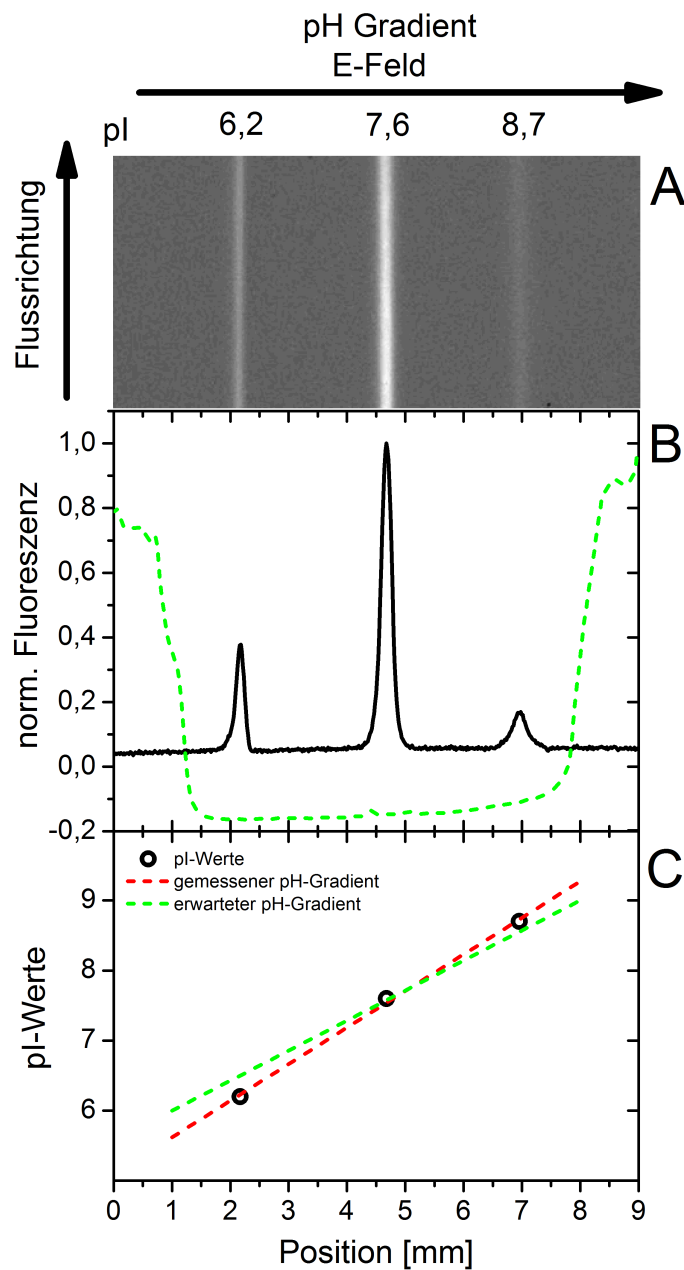
**Abbildung 4.16.:** Messung der IEF von IEF-Markern in Chip 1. Normierte Fluoreszenzen der IEF-Marker (a) und Anpassung der Fluoreszenzpeaks der IEF-Marker (b).

pI IEF-Marker	$x$ [mm] erwartet	$x$ [mm] gemessen	$\omega$ [mm]	$\sigma$ [mm]
6,2	1,50	2,17	0,14	0,07
7,6	4,75	4,68	0,18	0,09
8,7	7,30	6,96	0,27	0,13

**Tabelle 4.6.:** Ergebnisse für erwartete und gemessene Peakpositionen  $x$ , Peakbreiten  $\omega$  und Standardabweichungen  $\sigma$  der Peaks der IEF-Marker für Chip 1.

Der pH-Gradient ist vollständig ausgebildet und nahezu linear. Er weicht mit einer Steigung von  $m = 0,52$  allerdings leicht vom erwarteten pH-Gradienten mit einer Steigung von  $m = 0,43$  ab. Auf der  $x$ -Achse ist der IEF-Marker 6,2 um 0,67mm nach links und der IEF-Marker 8,7 um 0,34mm nach rechts verschoben.

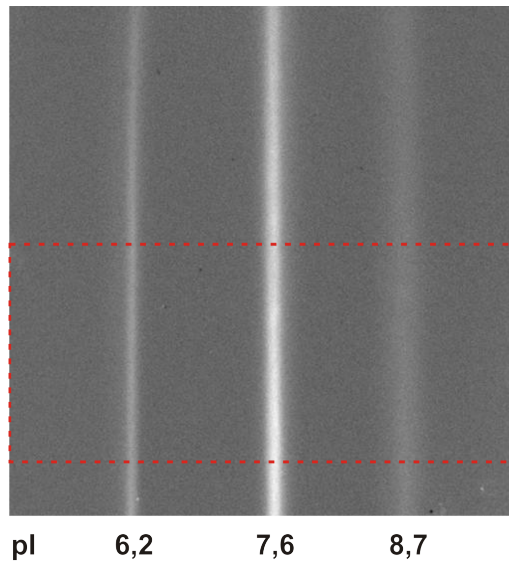
## 4.2. Parameter der isoelektrischen Fokussierung im $\mu$ FFE-Chip



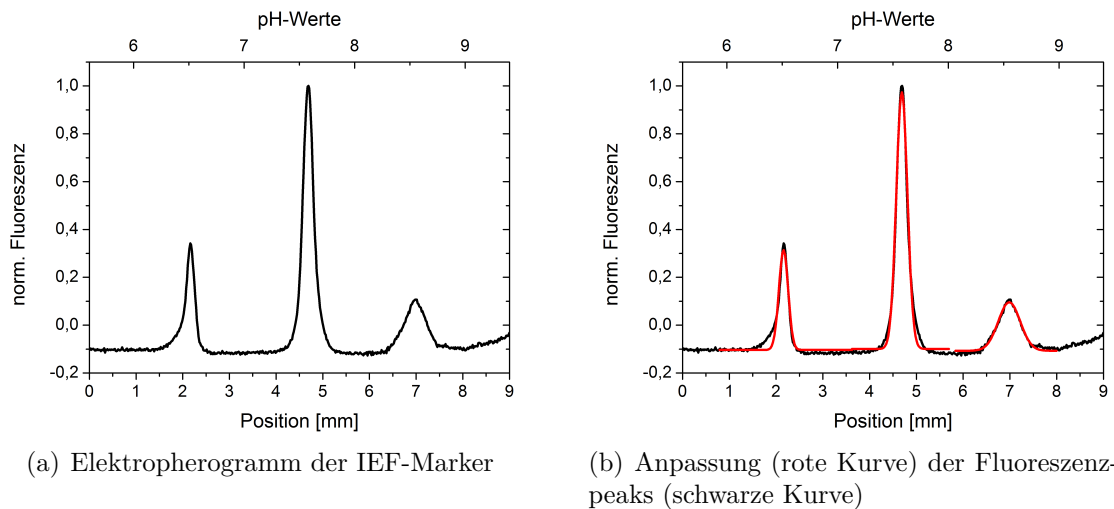
**Abbildung 4.17.:** Ausbildung des pH-Gradienten mit IEF-Markern in Chip 1. A: IEF-Marker fokussieren während der IEF. B: Elektropherogramm (Position in Abhängigkeit der norm. Fluoreszenz) der IEF-Marker (schwarze Kurve) und Ausdehnung des Stabilisierungspuffers (grüne gestrichelte Kurve). C: Auftragung der Peak-Position in Abhängigkeit der pI-Werte mit gemessenem und erwartetem pH-Gradienten.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### Ergebnisse für Chip 2



**Abbildung 4.18.:** IEF dreier IEF-Marker (pI 6,2; 7,6 und 8,7) in Chip 2 bei Anlegen einer Spannung von 210 V (0,71 mA). Der für die Auswertung berücksichtigte Bereich ist rot markiert.



**Abbildung 4.19.:** Messung der IEF von IEF-Markern in Chip 2. Normierte Fluoreszenzen der IEF-Marker (a) und Anpassung der Fluoreszenzpeaks der IEF-Marker (b).

In Abb. 4.18 ist die Aufnahme der FFIEF in Chip 2 zu sehen. Bei Anlegen einer Spannung von  $23 \text{ Vmm}^{-1}$  (Spannung  $U = 210 \text{ V}$ , Stromstärke  $I = 0,71 \text{ mA}$ ) werden



## 4.2. Parameter der isoelektrischen Fokussierung im $\mu$ FFE-Chip

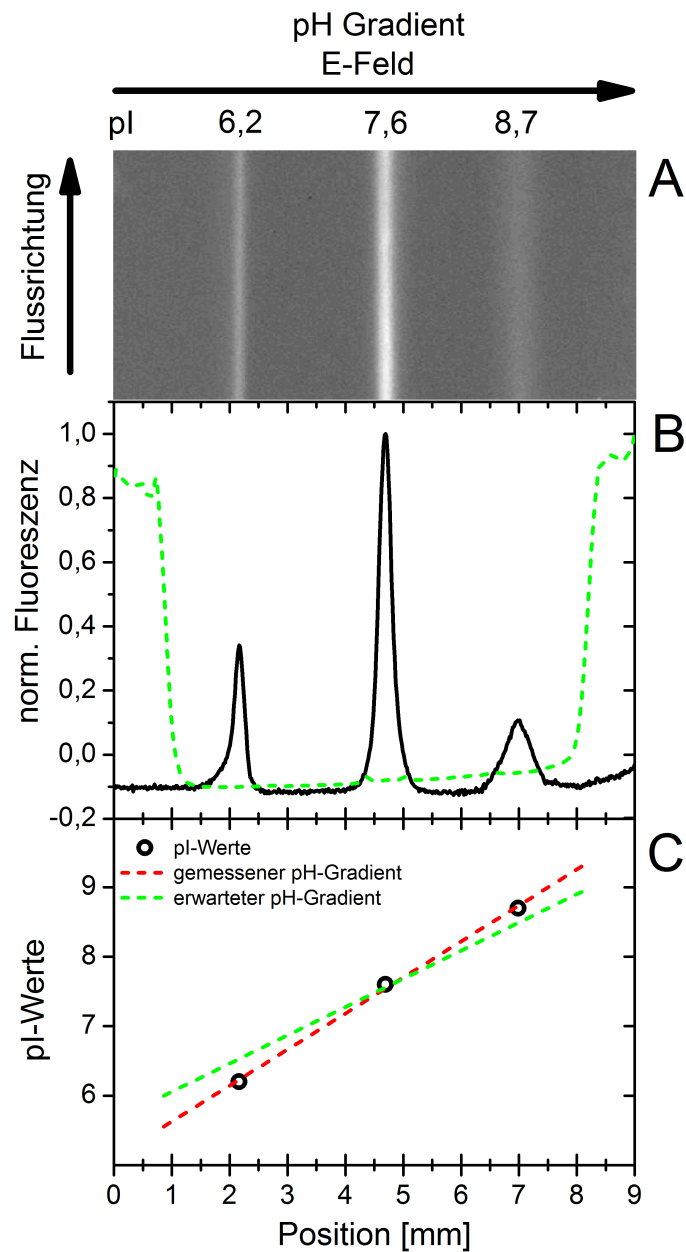
pI IEF-Marker	$x$ [mm] erwartet	$x$ [mm] gemessen	$\omega$ [mm]	$\sigma$ [mm]
6,2	1,35	2,16	0,19	0,10
7,6	4,81	4,69	0,24	0,12
8,7	7,49	6,99	0,46	0,23

**Tabelle 4.7.:** Ergebnisse für erwartete und gemessene Peakpositionen  $x$ , Peakbreiten  $\omega$  und Standardabweichungen  $\sigma$  der Peaks der IEF-Marker für Chip 2.

die IEF-Marker innerhalb weniger Sekunden aufgetrennt.

Abb. 4.19(a) zeigt das Elektropherogramm der drei IEF-Marker. In Abb. 4.19(b) ist die gleiche Auftragung mit entsprechender Kurvenanpassung zu sehen. Die Ergebnisse für Chip 2 sind in der Tabelle 4.7 aufgeführt. Zur Überprüfung der Linearität dient, wie zuvor auch, die Auftragung der Fluoreszenzintensität, die aus der IEF-Messung der Marker resultiert. Man erhält den experimentell interpolierten pH-Gradienten, wie in Abb. 4.20 dargestellt. Der pH-Gradient ist vollständig ausgebildet, nahezu linear und verläuft, wie bei Chip 1, mit einer Steigung von  $m = 0,52$  etwas steiler als der erwartete pH-Gradient ( $m = 0,41$ ). Wieder sind die Abweichungen bei den IEF-Markern 6,2 und 8,7 ausschlaggebend.

## 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.20.:** Ausbildung des pH-Gradienten mit IEF-Markern in Chip 2. A: IEF-Marker fokussieren während der IEF. B: Elektropherogramm (Position in Abhängigkeit der norm. Fluoreszenz) der IEF-Marker (schwarze Kurve) und Ausdehnung des Stabilisierungspuffers (grüne gestrichelte Kurve). C: Auftragung der Peak-Position in Abhängigkeit der pI-Werte mit gemessenem und erwartetem pH-Gradienten.

### Ergebnisse für Chip 3

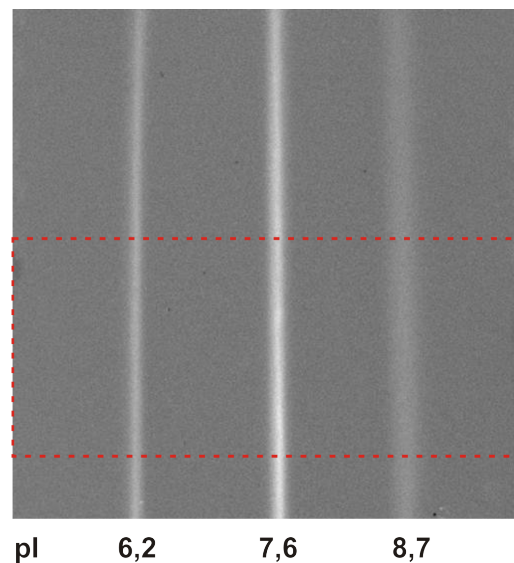
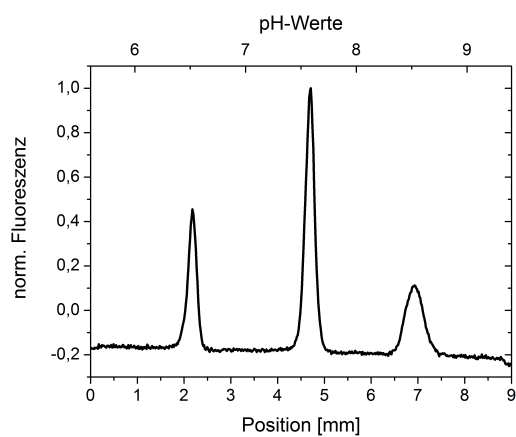
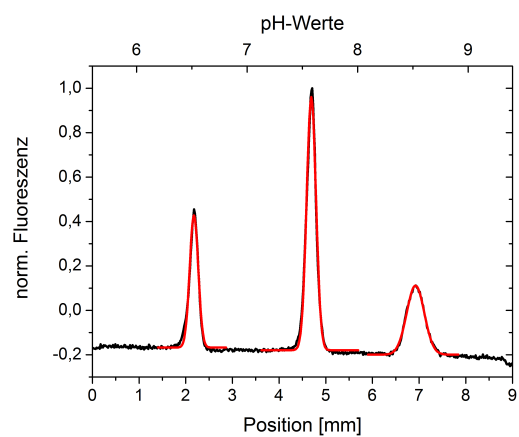


Abbildung 4.21.: IEF dreier IEF-Marker (pI 6,2; 7,6 und 8,7) in Chip 3 bei Anlegen einer Spannung von 210 V (0,67 mA). Der für die Auswertung berücksichtigte Bereich ist rot markiert.



(a) Elektropherogramm der IEF-Marker



(b) Anpassung (rote Kurve) der Fluoreszenzpeaks (schwarze Kurve)

Abbildung 4.22.: Messung der IEF von IEF-Markern in Chip 3. Normierte Fluoreszenzen der IEF-Marker (a) und Anpassung der Fluoreszenzpeaks der IEF-Marker (b).

Abb. 4.21 zeigt die Aufnahme der FFIEF in Chip 3. Bei Anlegen einer Spannung

## 4. Ergebnisse und Diskussion

pI IEF-Marker	$x$ [mm] erwartet	$x$ [mm] gemessen	$\omega$ [mm]	$\sigma$ [mm]
6,2	1,42	2,18	0,18	0,09
7,6	4,82	4,69	0,20	0,10
8,7	7,41	6,92	0,38	0,19

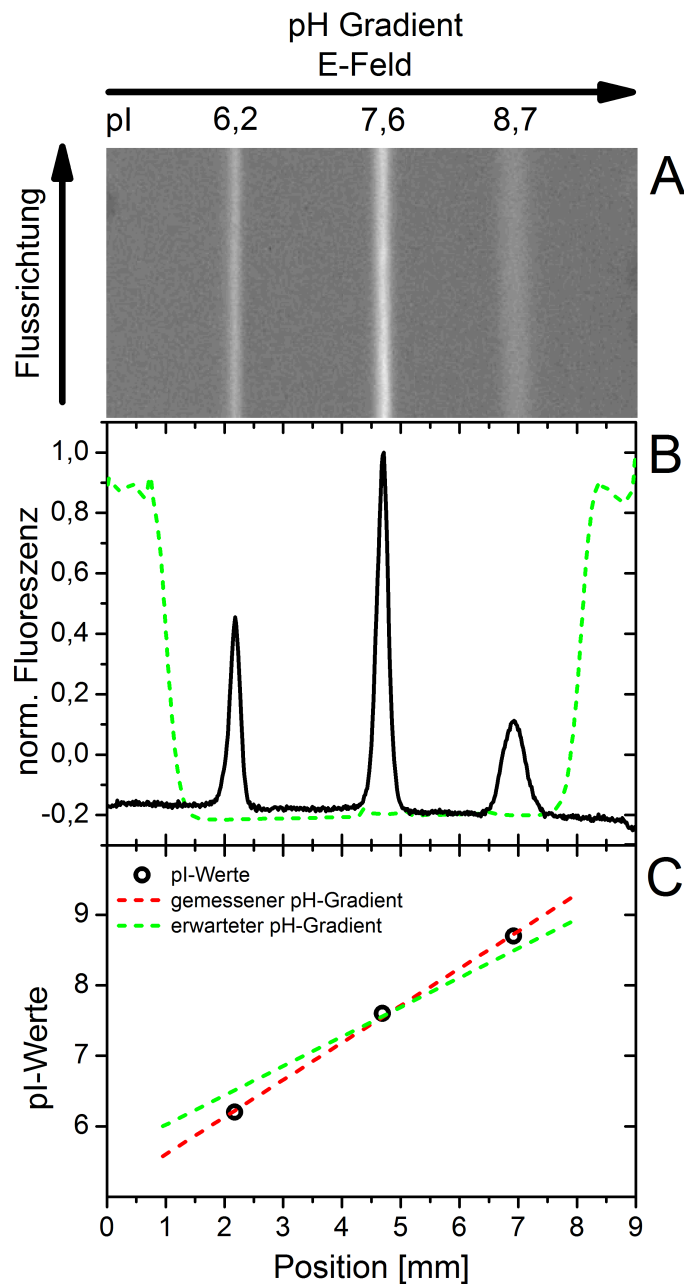
**Tabelle 4.8.:** Ergebnisse für erwartete und gemessene Peakpositionen  $x$ , Peakbreiten  $\omega$  und Standardabweichungen  $\sigma$  der Peaks der IEF-Marker für Chip 3.

von  $23 \text{ Vmm}^{-1}$  (Spannung  $U = 210 \text{ V}$ , Stromstärke  $I = 0,67 \text{ mA}$ ) werden die IEF-Marker innerhalb weniger Sekunden aufgetrennt.

Das Elektropherogramm der drei IEF-Marker und deren Anpassungen sind in Abb. 4.22(a) bzw. Abb. 4.22(b) zu sehen.

Die Ergebnisse für Chip 3 sind in der Tabelle 4.8 aufgeführt. Gemessener ( $m = 0,53$ ) und erwarteter ( $m = 0,42$ ) pH-Gradient zeigen näherungsweise den gleichen Verlauf wie in den vorherigen Messungen und auch hier fallen die Abweichungen der Peakpositionen der IEF-Marker 6,2 und 8,7 auf (siehe Abb. 4.23).

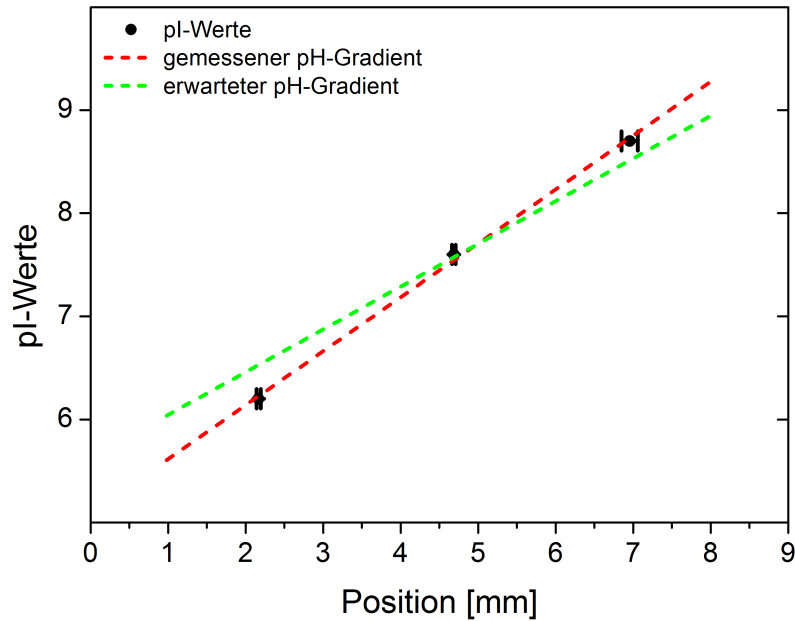
## 4.2. Parameter der isoelektrischen Fokussierung im $\mu$ FFE-Chip



**Abbildung 4.23.:** Ausbildung des pH-Gradienten mit IEF-Markern in Chip 3. A: IEF-Marker fokussieren während der IEF. B: Elektropherogramm (Position in Abhängigkeit der norm. Fluoreszenz) der IEF-Marker (schwarze Kurve) und Ausdehnung des Stabilisierungspuffers (grüne gestrichelte Kurve). C: Auftragung der Peak-Position in Abhängigkeit der pI-Werte mit gemessenem und erwartetem pH-Gradienten.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### Ergebnisse für Chip 1, Chip 2 und Chip 3 im pH-Bereich 6-9



**Abbildung 4.24.:** Mittelwerte der pH-Gradienten aus den IEF-Messungen in Chip 1, Chip 2 und Chip 3.

Aus Abbildung 4.24 erhält man den gemessenen und den erwarteten pH-Gradienten als Mittelwert aus den drei vorangegangenen Messungen. Der gemessene pH-Gradient verläuft mit einer Steigung von  $m = 0,52$  etwas steiler als der erwartete pH-Gradient mit  $m = 0,41$ . In Tabelle 4.9 sind die Mittelwerte für Peakpositionen  $x$ , Peakbreiten  $\omega$  und Standardabweichung  $\sigma$  angegeben.

IEF-Marker	$x$ [mm] erwartet	$x$ [mm] gemessen	$\omega$ [mm]	$\sigma$ [mm]
6,2	1,37	2,18	0,18	0,09
7,6	4,75	4,69	0,20	0,10
8,7	7,41	6,92	0,38	0,18

**Tabelle 4.9.:** Mittelwerte für Peakpositionen  $x$ , Peakbreiten  $\omega$  und Standardabweichung  $\sigma$  für Chip 1, Chip 2 und Chip 3.

Die Parameter für den Bereich pH 6-9 sind in Tabelle 4.10 aufgeführt. Entsprechend der Gleichungen 4.5 und 4.6 berechnen sich die Auflösung  $\Delta(pI)_{min}$  und Peak-Kapazität  $n$  mit den Werten  $d(\text{pH}) = 3$ , da sich der pH-Bereich von pH 6-9 erstreckt und  $L = 7,28$  mm als Mittelwert der Ausdehnung des Trennmediums und damit des pH-Gradienten zwischen dem Stabilisierungspuffer der drei verwendeten Chips.

### 4.3. Isoelektrische Fokussierung von Proteinen und Nukleinsäuren

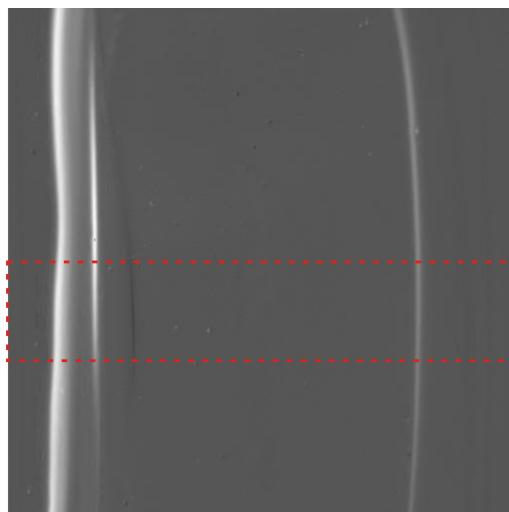
$\bar{\sigma}$ [mm]	$\Delta(pI)_{min}$ [pH-Einheiten]	Peak-Kapazität $n$ [Peaks]
$0,13 \pm 0,05$	0,16	14

**Tabelle 4.10.:** Parameter der  $\mu$ FFE für den pH-Bereich 6-9.

Die Ausdehnung des pH-Gradienten  $L$  im Chip ist im pH-Bereich 6-9 um fast 1 mm geringer als beim pH-Bereich 3-10 und die mittlere Standardabweichung der Peakbreite  $\sigma$  ist um 0,3 mm größer. Berücksichtigt man diese Sachverhalte, lassen sich der vergleichsweise erhöhte Wert für die Auflösung  $\Delta(pI)_{min}$  und der geringere Wert für die Peakkapazität  $n$  erklären.

### 4.3. Isoelektrische Fokussierung von Proteinen und Nukleinsäuren

Bei der experimentellen Untersuchung der IEF von Proteinen und Nukleinsäuren wurden die gleichen Medien verwendet, wie in den vorangegangenen Messungen zur Parameteruntersuchung. Die Elektrodenkanäle wurden auf der Seite der Anode mit 100 mM Phosphorsäurelösung und auf der Seite der Kathode mit 50 mM Natriumhydroxidlösung versorgt. Als anodaler Stabilisierungspuffer wurde eine 100 mM Phosphorsäurelösung mit 0,1 % Tween 20 und 0,2 % HPMC und als kathodaler Stabilisierungspuffer wurde eine 50 mM Natriumhydroxidlösung mit 0,1 % Tween 20 und 0,2 % HPMC verwendet. Das Trennmedium bestand aus einer 0,4 %igen Ampholytlösung (pH 3-10) mit 0,1 % Tween 20 und 0,2 % HPMC.



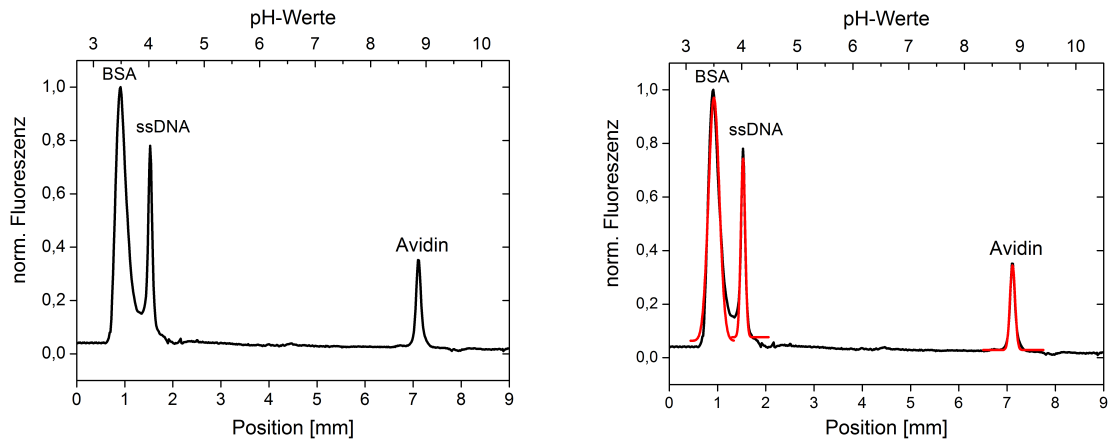
**Abbildung 4.25.:** IEF von BSA, Avidin und ssDNA. Der für die Auswertung berücksichtigte Bereich ist rot markiert.

Nachdem sich ein kontinuierliches Flussprofil eingestellt hatte ( $1,1 \text{ mm s}^{-1}$  im

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Trennraum und  $0,5 \text{ mm s}^{-1}$  in den Elektrodenkanälen), wurde eine Spannung von  $380 \text{ V}$  ( $U = 42 \text{ V mm}^{-1}$  bei einer Stromstärke von  $1,25 \text{ mA}$ ) eingestellt.

Das Proteingemisch (BSA,  $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; Avidin,  $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; ssDNA,  $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  in PBS-Pufferlösung (pH 7,4)) trennte sich innerhalb von Sekunden in drei Banden auf (siehe Abb. 4.25). Die Fokussierung von ssDNA erfolgt jedoch nicht über die gesamte Kanallänge. Die Intensität der Bande nahm in Richtung Einlass und auch in Richtung Auslass ab.



(a) Elektropherogramm von BSA, Avidin und ssDNA

(b) Anpassung (rote Kurve) der Fluoreszenzpeaks (schwarze Kurve)

**Abbildung 4.26.:** Messung der IEF von BSA, Avidin und ssDNA. Normierte Fluoreszenzen der IEF-Marker (a) und Anpassung der Fluoreszenzpeaks der IEF-Marker (b).

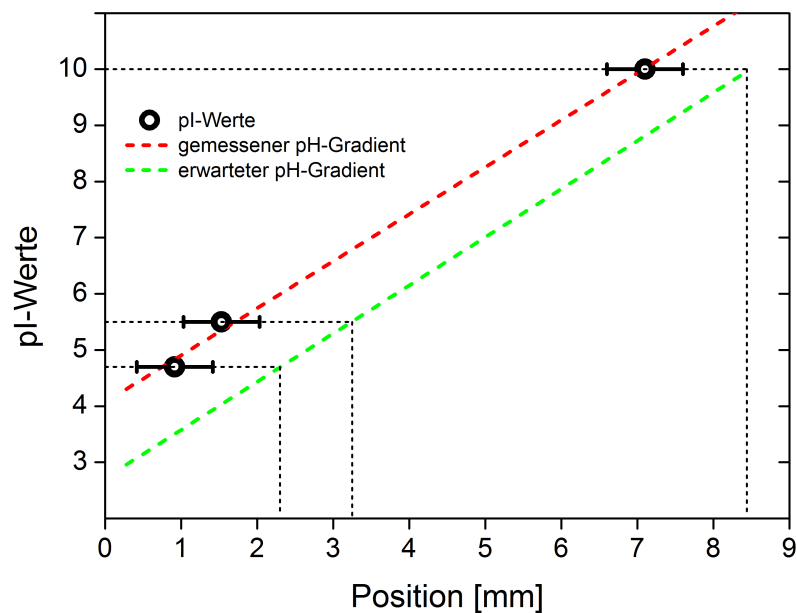
Substanz (pI)	$x$ [mm] erwartet	$x$ [mm] gemessen	$\omega$ [mm]	$\sigma$ [mm]
BSA (4,7)	2,30	0,93	0,22	0,11
ssDNA (5,5)	3,25	1,53	0,09	0,05
Avidin (10-10,5)	8,45	7,11	0,11	0,05

**Tabelle 4.11.:** Ergebnisse für Peak-Positionen  $x$ , Peakbreiten  $\omega$  und Standardabweichungen  $\sigma$  der Peaks für die IEF von BSA, ssDNA und Avidin.

Das Elektropherogramm der Proteine und der ssDNA ist in Abb. 4.26(a) zu sehen und die gleiche Auftragung mit entsprechender Kurvenanpassung (unter Annahme einer Gauß'schen Konzentrationsverteilung) ist in in Abb. 4.26(b) dargestellt. Die Skala der pH-Werte ergibt sich aus den Spezifikationen der Ampholytlösung, die vom Stabilisierungspuffer eingeschlossen ist. Anhand der Peakpositionen und



### 4.3. Isoelektrische Fokussierung von Proteinen und Nukleinsäuren



**Abbildung 4.27.:** Peak-Positionen der Proteine und ssDNA in Abhängigkeit vom pI.

der pI-Werte für die Substanzen erhält man den experimentell interpolierten pH-Gradienten, wie in Abb. 4.27 dargestellt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.11 aufgeführt. Der in der ersten Spalte angegebene pI-Wert entspricht der Spezifikation der jeweiligen Substanz. Der erwartete x-Wert ergibt sich aus dem Verlauf des erwarteten pH-Gradienten in Zusammenhang mit dem jeweiligen pI-Wert. Der aufgrund der Spezifikationen der Ampholytlösung erwartete pH-Gradient ergibt sich aus der Ausdehnung des Trennmediums im Chip ( $L = 8,16$  mm). Die Steigung von gemessenem pH-Gradienten ( $m = 0,84$ ) liegt im selben Intervall wie die Steigung des erwarteten pH-Gradienten ( $m = 0,86$ ), was auf eine gleichmäßige Ausdehnung der Ampholytlösung hinweist.

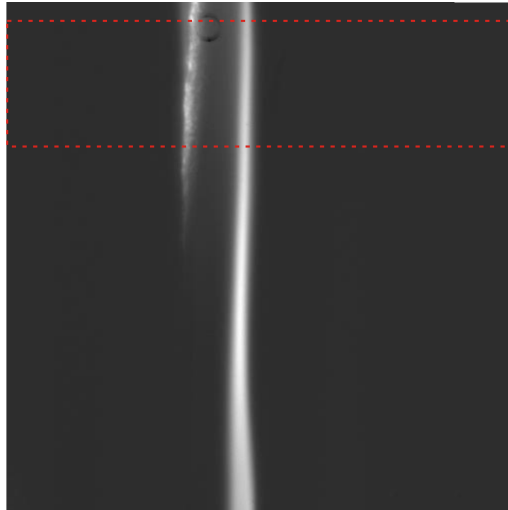
Jedoch sind alle drei Peakpositionen  $x$  auf der x-Achse durchschnittlich um fast 1,5 mm nach links (zur Anode hin) verschoben. Wenn man die Abweichung auf die pI-Werte bezieht, liegen diese im Durchschnitt um 1,3 pH-Einheiten unterhalb der spezifizierten pI-Werte. Die in Abb. 4.27 angegebenen Fehlerbalken geben den systematischen Justierfehler des Messsystems an. Außerdem können, wie schon in Kap. „Fluoreszenzfarbstoffe“ auf S. 58 erwähnt, die an die Proteine und ssDNA gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe den pI signifikant verändern. Die pI-Differenz (markiert-unmarkiert) beträgt nach [83] im Fall von Markierungen mit FITC für Proteine mit einem nativen pI im neutralen Bereich ca. -1,15 pH-Einheiten und verringert sich in Richtung niedriger pI-Werte linear zu -0,15 pH-Einheiten (bei einem pI von 5,1). Dieses Beispiel zeigt, dass Fluoreszenzmarker zum Teil deutliche Veränderungen der nativen pI-Werte bewirken können.

Da hier ausschließlich die Funktionalität des konstruierten Mikrochips und der Nachweis von Substanzen untersucht wird, wird die Genauigkeit der Bestimmung unbekannter pI-Werte an dieser Stelle nicht weiter verfolgt.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.4. Isoelektrische Fokussierung von Strep-Tactin®/GFP

Für die Untersuchung der IEF des Systems Strep-Tactin®/GFP und GFP wurden die gleichen Medien verwendet wie für die Messung der IEF von Proteinen und ssDNA.

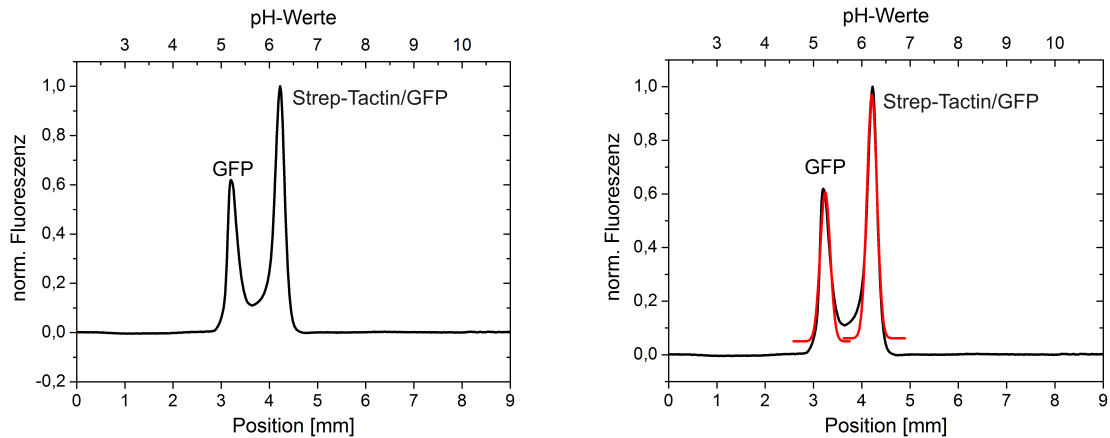


**Abbildung 4.28.:** IEF von GFP und Strep-Tactin®/GFP. Der für die Auswertung berücksichtigte Bereich ist rot markiert.

Nachdem sich ein kontinuierliches Flussprofil eingestellt hatte ( $1,4 \text{ mm s}^{-1}$  für den Trennraum und  $0,4 \text{ mm s}^{-1}$  für jeden Elektrodenkanal), wurde eine Spannung von  $90 \text{ V}$  ( $U = 10 \text{ V mm}^{-1}$  bei einer Stromstärke von  $0,76 \text{ mA}$ ) eingestellt. Das Gemisch (GFP  $6,25 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ , Strep-Tactin®  $1,25 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ), bei dem GFP im Überschuss vorlag, trennte sich innerhalb von Sekunden in zwei Banden auf (siehe Abb. 4.28), wie zuvor in Kap. „Verwendete Proteine, Nukleinsäuren und Immunglobuline“, Abb. 3.19 skizziert. Die Fokussierung von GFP findet nicht über die gesamte Kanallänge statt, sondern ist nur in der oberen Hälfte beobachtbar.

Das Elektropherogramm von GFP und Strep-Tactin®/GFP ist in Abb. 4.29(a) zu sehen. Die gleiche Auftragung mit entsprechender Kurvenanpassung (unter Annahme einer Gauß'schen Konzentrationsverteilung) wird in Abb. 4.29(b) dargestellt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4.12 aufgeführt. Da die genauen pI-Werte der Substanzen nicht bekannt sind, ist nur der erwartete pH-Gradient aufgetragen (siehe Abb. 4.30). Dieser ergibt sich aus der Ausdehnung des Trennmediums im Chip ( $L = 7,0 \text{ mm}$ ). Die den Peakpositionen mit Hilfe des erwarteten pH-Gradienten zugeordneten pI-Werte in Abb. 4.30 sind durch eine schwarze unterbrochenen Linie angedeutet. Diese so gewonnenen Werte liegen im Bereich der spezifizierten pI-Werte

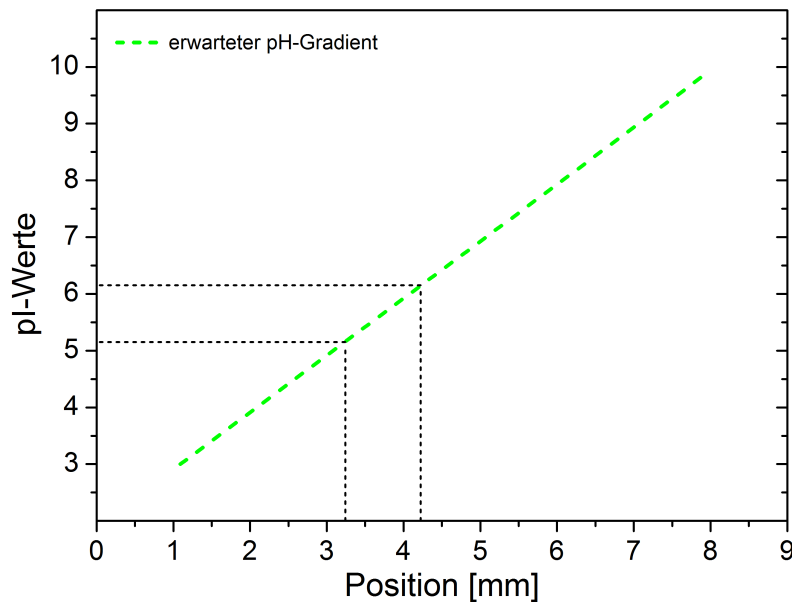
#### 4.4. Isoelektrische Fokussierung von Strep-Tactin®/GFP



(a) Elektropherogramm von GFP und Strep-Tactin®/GFP

(b) Anpassung (rote Kurve) der Fluoreszenzpeaks (schwarze Kurve)

**Abbildung 4.29.:** Messung der IEF von GFP und Strep-Tactin®/GFP. Normierte Fluoreszenzen der IEF-Marker (a) und Anpassung der Fluoreszenzpeaks der IEF-Marker (b).



**Abbildung 4.30.:** Peak-Positionen von GFP und Strep-Tactin®/GFP in Abhängigkeit des pI.

(siehe Tab. 4.11). Strep-Tactin® hat einen pI im neutralen pH-Bereich (siehe Kapitel „Verwendete Proteine, Nukleinsäuren und Immunglobuline“ auf S. 72) und der pI von GFP liegt bei pH 4,6-5,1. Anhand des erwarteten pH-Gradienten erhält man für das Strep-Tactin®/GFP-System einen im Vergleich zum Strep-Tactin® etwas in den sauren pH-Bereich verschobenen pI von 6,15, was sich durch die Ankopplung von GFP erklären lässt. Es ist also davon auszugehen, dass sich die Ampholytlösung

## 4. Ergebnisse und Diskussion

gleichmäßig im Chip ausgedehnt und sich ein linearer pH-Gradient ausgebildet hat.

Substanz (pI)	pI erwartet	$x$ [mm] erwartet	$\omega$ [mm]	$\sigma$ [mm]
GFP (4,6-5,1)	5,15	3,24	0,21	0,10
Strep-Tactin®/GFP (nicht bekannt)	6,15	4,21	0,21	0,10

**Tabelle 4.12.:** Ergebnisse für Peak-Positionen  $x$ , Peakbreiten  $\omega$  und Standardabweichungen  $\sigma$  der Peaks für die IEF von GFP und Strep-Tactin®/GFP.

## 4.5. Durchführung eines Immunoassays im $\mu$ FFE-Chip

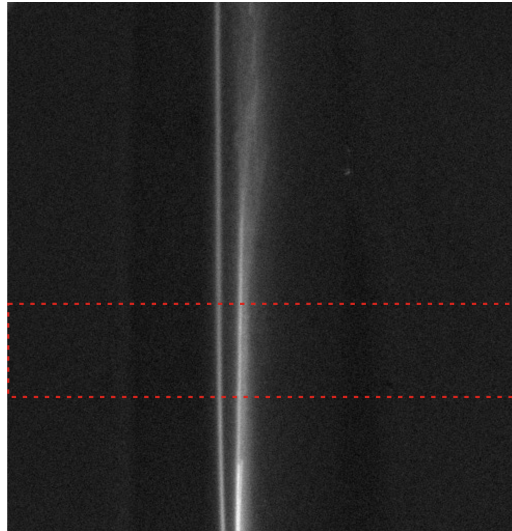
### 4.5.1. Isoelektrische Fokussierung von Immunglobulinen

Für die Untersuchung der IEF des Systems IgG/Anti-IgG und Anti-IgG wurden die gleichen Medien verwendet wie zuvor bei der IEF von Proteinen und ssDNA sowie bei der IEF von Strep-Tactin®/GFP. Das Trennmedium bestand aus einer 0,4%igen Ampholytlösung (pH 6-9) mit 0,1% Tween 20 und 0,2% HPMC.

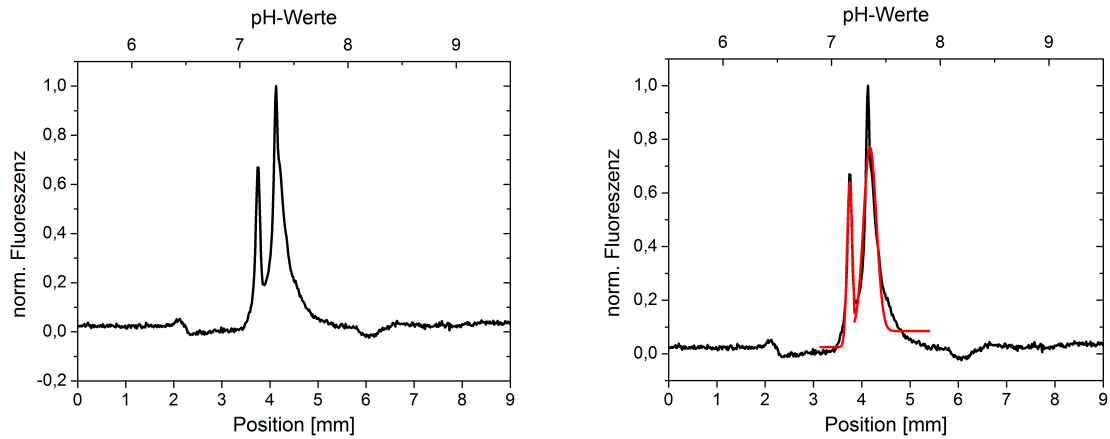
Nachdem sich ein kontinuierliches Flussprofil eingestellt hatte ( $1,8 \text{ mm s}^{-1}$  für den Trennraum und  $0,6 \text{ mm s}^{-1}$  für jeden Elektrodenkanal), wurde eine Spannung von 60 V ( $U = 6,7 \text{ V mm}^{-1}$  bei einer Stromstärke von 0,79 mA) eingestellt. Das Gemisch (IgG,  $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ; Anti-IgG,  $4 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ), bei dem markiertes Anti-IgG im Überschuss vorlag, trennte sich innerhalb von Sekunden in zwei Stränge auf (siehe Abb. 4.31), wie zuvor in Kapitel „Verwendete Proteine, Nukleinsäuren und Immunglobuline“, Abb. 3.20 skizziert. Allerdings verlaufen die Stränge nicht vollständig parallel und die rechte Bande weist eine zum Ausfluss hin breiter werdende Flanke nach rechts auf.

Das Elektropherogramm von Anti-IgG und IgG/Anti-IgG ist in Abb. 4.32(a) zu sehen und die gleiche Auftragung mit entsprechender Kurvenanpassung (unter Annahme einer Gauß'schen Konzentrationsverteilung) in Abb. 4.32(b). Die Anpassung von Peak 2 erwies sich als schwierig, wie man der Abbildung entnehmen kann. Der Abstand der Peaks beträgt  $\Delta x = 0,42 \text{ mm}$ , was einer pI-Differenz von  $\Delta(pI) = 0,18$  entspricht, und befindet sich direkt an der Auflösungsgrenze des Chips ( $\Delta(pI)_{min} = 0,16$ ). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.13 aufgeführt. Der erwartete pH-Gradient (siehe Abb. 4.33) ergibt sich aus der Ausdehnung des Trennmediums im Chip ( $L = 6,9 \text{ mm}$ ). Die den Peakpositionen mit Hilfe des erwarteten pH-Gradienten zugeordneten pI-Werte in Abb. 4.33 sind durch eine schwarze unterbrochene Linie angedeutet. Laut Spezifikation liegt der pI von IgG im pH-Bereich 6,1-8,5. Die experimentell gewonnenen Werte liegen im angegebenen Bereich (siehe Tab. 4.12).

## 4.5. Durchführung eines Immunoassays im $\mu$ FFE-Chip



**Abbildung 4.31.:** IEF von IgG/Anti-IgG und Anti-IgG. Der für die Auswertung berücksichtigte Bereich ist rot markiert.



(a) Elektropherogramm von IgG/Anti-IgG und Anti-IgG

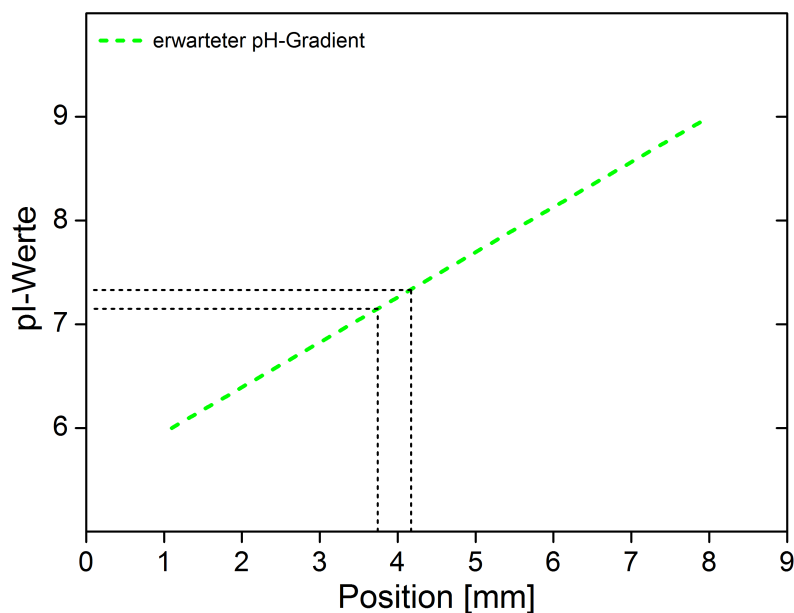
(b) Anpassung (rote Kurve) der Fluoreszenzpeaks (schwarze Kurve)

**Abbildung 4.32.:** Messung der IEF von IgG/Anti-IgG und Anti-IgG. Normierte Fluoreszenzen der IEF-Marker (a) und Anpassung der Fluoreszenzpeaks der IEF-Marker (b).

	pI erwartet	$x$ [mm] erwartet	Peakbreite $\omega$ [mm]	$\sigma$ [mm]
Peak 1	7,15	3,75	0,11	0,06
Peak 2	7,33	4,17	0,26	0,13

**Tabelle 4.13.:** Ergebnisse für Peak-Positionen  $x$ , Peakbreiten  $\omega$  und Standardabweichungen  $\sigma$  der Peaks für die IEF von IgG/Anti IgG.

## 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.33.:** Peak-Positionen von IgG/Anti-IgG und Anti-IgG in Abhängigkeit vom pI.

Die Bindung von IgG und Anti-IgG kann somit bestätigt und neben dem im Überschuss vorhandenen Anti-IgG nachgewiesen werden. Damit zeigt sich, dass sich der Komplex IgG/Anti-IgG und Anti-IgG mit der Methode der FFIEF auftrennen lässt. Dieses Verfahren kann auf Antigen-Antikörper-Systeme übertragen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, einen Immunoassay im  $\mu$ FFE-Chip mit Konzentrationen bis zu  $10^{-12}$  mol/l, also im gleichen Konzentrations-Bereich wie beim ELISA, durchzuführen. Die beim ELISA verwendete Probenmenge beträgt  $100 \mu\text{l}$  pro Well. Im gleichen Bereich liegt auch das Volumen für die IEF im  $\mu$ FFE-Chip.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wird eine neue Methode zur Herstellung eines  $\mu$ FFE-Chips und dessen Funktionsweise anhand von FFIEF-Messungen unterschiedlicher biologischer Systeme vorgestellt.

Die Herstellung des vorgestellten Chips, der ein Füllvolumen von  $9,5 \mu\text{l}$  im Trennraum umfasst, ist einfach zu realisieren und in weniger als einer Stunde umzusetzen. Strukturgebend sind dabei zwei Transferklebebänder, die zwischen zwei PMMA-Platten fixiert werden. Als Abtrennung zwischen Trenn- und Elektrodenraum dienen Trennstege, die einen Eintritt von Gasblasen in den Trennraum verhindern, jedoch gleichzeitig einen Ionenaustausch ermöglichen können. So wird der Einsatz von Membranen, die oft schwer in den Chip zu integrieren und instabil sind, unnötig. Kostspielige Reinraumverfahren sowie Ätz- und Waschprozesse werden im Herstellungsprozess umgangen. Der  $\mu$ FFE-Chip kann als „Einwegartikel“ genutzt werden.

Die Bearbeitung der PMMA-Platten und der Transferklebebänder ist unkompliziert und ermöglicht eine Maßstabsvergrößerung der Produktion von  $\mu$ FFE-Chips. Die verwendeten Materialien des Chips zeigen über einen Zeitraum von 20 Betriebsstunden gute chemische und mechanische Beständigkeit. Sie sind für schwache Säuren und Basen und alle wässrigen Lösungen, die im Allgemeinen für die FFIEF genutzt werden, geeignet und die Dichtigkeit bleibt gewährleistet. Durch die milden pH-Bedingungen, unter denen die Auftrennungen stattfinden, wird die Integrität der Proteine, Oligonukleotide und Immunglobuline nicht signifikant beeinflusst.

Eine Herausforderung ist die Integration der Platinelektroden in den Chip, die mit dem sogenannten *Ink-jet-Verfahren* überwunden werden könnte, bei dem die Elektroden in den Chip gedruckt werden [99].

Die Funktionalität des Chips wurde anhand von IEF-Markern überprüft und konnte bestätigt werden. Als reales System wurde die IEF von markiertem BSA, Avidin und ssDNA gezeigt. Die Auftrennung erfolgte innerhalb von wenigen Sekunden. Als weiteres biologisches System wurde Strep-Tactin®/GFP isoelektrisch fokussiert.

Für zukünftige Arbeiten ist die markierungsfreie Analyse mittels Oberflächenplasmonen-Resonanz (engl. *Surface Plasmon Resonance*, SPR) [1], Ramanspektroskopie oder oberflächenverstärkter Raman-Streuung (engl. *surface-enhanced raman scattering*, SERS) [41] im  $\mu$ FFE-Chip eine Erweiterungsmöglichkeit.

Im Moment ist die experimentelle Bestimmung unbekannter isoelektrischer Punkte von Substanzen mit dem hier vorgestellten Chip nur eingeschränkt möglich, da sowohl die IEF der pI-Marker als auch die IEF der untersuchten Proteine, ssDNA und Immunglobuline nur bei bestimmten aufeinander abgestimmten Einstellun-

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

gen von Flussgeschwindigkeiten und Spannung möglich sind. Eine Optimierung des  $\mu$ FFE-Chips hinsichtlich der Bestimmung der isoelektrischen Punkte unbekannter biologische Systeme während der IEF ist deshalb ein weiterer wichtiger Entwicklungsschritt für die Zukunft. Diesbezüglich zeigen auch  $\mu$ FFE-Chips mit integrierter Fluoreszenz-Sensor-Schicht für die Echtzeit-pH-Messung bei der IEF schon vielversprechende Ergebnisse [101].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die erfolgreiche Durchführung eines Fluoreszenz-Immunoassay im  $\mu$ FFE-Chip gezeigt werden. Ein System aus IgG und markiertem Anti-IgG ließ sich mit der Methode der FFIEF auftrennen. Dieses Verfahren kann auf Antigen-Antikörper-Systeme übertragen werden. Aus der Messung des LOD ergab sich die Möglichkeit einer Konzentrationsreduzierung bis zu  $10^{-12}$  mol/l. Für zukünftige Arbeiten kann eine Konzentrationsreduzierung der Analyte angestrebt werden. Im Vergleich zu anderen Fluoreszenz-Festphasen-Immunoassays, die sich auf Glas im Bereich einer IgG-Konzentration von  $10^{-9}$  mol/l und  $10^{-15}$  mol/l mit SERS oder bei der Immuno-PCR im Bereich von  $10^{-18}$  mol/l befinden, ist noch Spielraum vorhanden.

Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Immunoassay im  $\mu$ FFE-Chip ist ein qualitativer Nachweis möglich. Um bei einer unbekanntem Antigen-Konzentration einen quantitativen Nachweis anhand der detektierten Fluoreszenzintensität treffen zu können, müsste, wie beim ELISA, eine Optimierung und Validierung vorgenommen werden. Dazu wäre die Entwicklung entsprechender Kalibrierungskurven und die genaue Abstimmung aller verwendeten Komponenten aufeinander notwendig. Bei der Übertragung eines Immuno-PCR auf den  $\mu$ FFE-Chip wäre der Weg geebnet, um höchstmögliche Sensitivitäten zu erlangen. Zusätzliche Bestrebungen, Proteine und andere Analyte so verlässlich und mit einer so hohen Sensitivität wie Nukleinsäuren bei der PCR detektieren zu können, würden auf dem Gebiet der molekularen und medizinischen Diagnostik einen großen Fortschritt bedeuten.



# A. Anhang

## Verwendete Chemikalien

- Polyvinylalkohol ( $\geq 99\%$ , hydrolysiert; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf, Deutschland)
- Tris-Puffer ( $\geq 98\%$ , pH 8,5; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf, Deutschland)
- Rinderalbumin (BSA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf, Deutschland)
- Avidin (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- DNA-Einzelstrang 5'-GAGGTCGTATAGGGG-3' (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Strep-tag®-Strep Tactin® (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland)
- GFP-green fluorescent protein (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Anti-IgG (Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG (H+L) Antibody; Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- IgG (purified rabbit IgG; Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Phosphorsäurelösung ( $\geq 98\%$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , pH 2; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf, Deutschland)
- Natriumhydroxidlösung ( $\geq 99\%$ , NaOH, pH 13; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf, Deutschland)
- HPMC (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf, Deutschland)
- Ampholytlösung (Servalyt, pH 3-10 bzw. pH 6-9, 40 % w/v (weight to volume) in Wasser, analytical grade; Serva Electrophoresis,



# Literaturverzeichnis

- [1] Dietrich Kohlheyer, Jan C. T. Eijkel, Albert van den Berg, and Richard B. M. Schasfoort. Miniaturizing free-flow electrophoresis – a critical review. *Electrophoresis*, 29(5):977–993, 2008. ISSN 0173-0835. doi: 10.1002/elps.200700725.
- [2] Dorian Immler, Simone Greven, and Peter Reinemer. Targeted proteomics in biomarker validation: Detection and quantification of proteins using a multi-dimensional peptide separation strategy. *PROTEOMICS*, 6(10):2947–2958, 2006. ISSN 16159853. doi: 10.1002/pmic.200500659.
- [3] Robert L. Moritz, Andrew B. Clippingdale, Eugene A. Kapp, James S. Eddes, Hong Ji, Sam Gilbert, Lisa M. Connolly, and Richard J. Simpson. Application of 2-D free-flow electrophoresis/RP-HPLC for proteomic analysis of human plasma depleted of multi high-abundance proteins. *PROTEOMICS*, 5(13): 3402–3413, 2005. ISSN 16159853. doi: 10.1002/pmic.200500096.
- [4] Dietrich Kohlheyer, Geert A. J. Besselink, Stefan Schlautmann, and Richard B. M. Schasfoort. Free-flow zone electrophoresis and isoelectric focusing using a microfabricated glass device with ion permeable membranes. *Lab on a Chip*, 6(3):374, 2006. ISSN 1473-0197. doi: 10.1039/B514731J.
- [5] Chao-Xuan Zhang and Andreas Manz. High-Speed Free-Flow Electrophoresis on Chip. *Analytical Chemistry*, 75(21):5759–5766, 2003. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac0345190.
- [6] Dosil Pereira de Jesus, Lucas Blanes, and Claudimir Lucio do Lago. Microchip free-flow electrophoresis on glass substrate using laser-printing toner as structural material. *Electrophoresis*, 27(24):4935–4942, 2006. ISSN 0173-0835. doi: 10.1002/elps.200600137.
- [7] Holger Becker. It’s the economy. . . . *Lab on a Chip*, 9(19):2759, 2009. ISSN 1473-0197. doi: 10.1039/b916505n.
- [8] Holger Becker. Mind the gap! *Lab on a Chip*, 10(3):271, 2010. ISSN 1473-0197. doi: 10.1039/b925993g.
- [9] Yong Zhang, Guichen Ping, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi, and Yoshinobu Baba. Dynamic modification of poly(methyl methacrylate) chips using poly(vinyl alcohol) for glycosaminoglycan disaccharide isomer separation. *Electrophoresis*, 28(18):3308–3314, 2007. ISSN 0173-0835. doi: 10.1002/elps.200700088.

- [10] Stefan Köhler, Claudia Weilbeer, Steffen Howitz, Holger Becker, Volker Beushausen, and Detlev Belder. PDMS free-flow electrophoresis chips with integrated partitioning bars for bubble segregation. *Lab on a Chip*, 11(2):309, 2011. ISSN 1473-0197. doi: 10.1039/c0lc00347f.
- [11] Stefan Köhler, Christian Benz, Holger Becker, Erik Beckert, Volker Beushausen, and Detlev Belder. Micro free-flow electrophoresis with injection molded chips. *RSC Advances*, 2(2):520, 2011. ISSN 2046-2069. doi: 10.1039/c1ra00874a.
- [12] Daniel E. Raymond, Andreas Manz, and H. Michael Widmer. Continuous Sample Pretreatment Using a Free-Flow Electrophoresis Device Integrated onto a Silicon Chip. *Analytical Chemistry*, 66(18):2858–2865, 1994. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac00090a011.
- [13] Dirk Janasek, Joachim Franzke, and Andreas Manz. Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. *Nature*, 442(7101):374–380, 2006. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature05059.
- [14] Pedro Arce Maria A. Bosse. Role of Joule heating in dispersive mixing effects in electrophoretic cells: Convective-diffusive transport aspects. *Electrophoresis*, 21(5):1026–1033, März 2000. ISSN 0173-0835.
- [15] A. Manz, N. Graber, and H.M. Widmer. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1(1-6):244–248, 1990. ISSN 09254005. doi: 10.1016/0925-4005(90)80209-I.
- [16] Henrik Bruus. *Theoretical microfluidics*. Oxford Univ. Press, Oxford [u.a.], 2008. ISBN 9780199235094.
- [17] K. Hannig. Neue Möglichkeiten zur Trennung von Makromolekülen mit Hilfe der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese. *Kolloid-Zeitschrift & Zeitschrift für Polymere*, 227(1-2):37–41, 1968. ISSN 0303-402X. doi: 10.1007/BF02085275.
- [18] Dietrich Kohlheyer, Jan C. T. Eijkel, Stefan Schlautmann, Albert van den Berg, and Richard B. M. Schasfoort. Microfluidic High-Resolution Free-Flow Isoelectric Focusing. *Analytical Chemistry*, 79(21):8190–8198, 2007. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac071419b.
- [19] Bryan R. Fonslow and Michael T. Bowser. Free-Flow Electrophoresis on an Anodic Bonded Glass Microchip. *Analytical Chemistry*, 77(17):5706–5710, 2005. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac050766n.
- [20] Yi Xu, Chao-Xuan Zhang, Dirk Janasek, and Andreas Manz. Sub-second isoelectric focusing in free flow using a microfluidic device. *Lab on a Chip*, 3(4):224, 2003. ISSN 1473-0197. doi: 10.1039/b308476k.

- [21] A. Pfützner, M. Safinowski, M. Nissum, U. Sukop, G. Weber, C. Eckerskorn, and T. Forst. Eine Plasmaextraktion durch Free-Flow-Elektrophorese ermöglicht die selektive Bestimmung von Insulinanaloga in Gegenwart von endogenem Normalinsulin. *Diabetologie und Stoffwechsel*, 3(S 1), 2008. ISSN 1861-9002. doi: 10.1055/s-2008-1076185.
- [22] Ryan T. Turgeon, Bryan R. Fonslow, Meng Jing, and Michael T. Bowser. Measuring Aptamer Equilibria Using Gradient Micro Free Flow Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 82(9):3636–3641, 2010. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac902877v.
- [23] Seong Ho Kang, Mira Park, and Keunchang Cho. Separation of DNA fragments for fast diagnosis by microchip electrophoresis using programmed field strength gradient. *Electrophoresis*, 26(16):3179–3184, 2005. ISSN 0173-0835. doi: 10.1002/elps.200500240.
- [24] Meng Jing and Michael T. Bowser. Isolation of DNA aptamers using micro free flow electrophoresis. *Lab on a Chip*, 11(21):3703, 2011. ISSN 1473-0197. doi: 10.1039/c1lc20461k.
- [25] Bruce A. Buchholz, Kurt W. Haack, Jennifer L. Sporty, Alan R. Buckpitt, and Dexter Morin. Free flow electrophoresis separation and AMS quantitation of <sup>14</sup>C-naphthalene-protein adducts. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 268(7-8):1324–1327, 2010. ISSN 0168583X. doi: 10.1016/j.nimb.2009.10.164.
- [26] Nishikant V. Wase, Saw Yen Ow, Malinda Salim, Mikkel Nissum, and Mike Whalley. A Free Flow Electrophoresis Separation Strategy for Segregation of High Abundant Phycobilisomes from Cyanobacterium *Nostoc punctiforme* PCC 73102. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 05(03), 2012. ISSN 0974276X. doi: 10.4172/jpb.1000215.
- [27] Bo Højen Justesen, Tomas Laursen, Gerhard Weber, Anja Thoe Fuglsang, Birger Lindberg Møller, and Thomas Günther Pomorski. Isolation of Monodisperse Nanodisc-Reconstituted Membrane Proteins Using Free Flow Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 2013. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac4000915.
- [28] Yong-Ak Song, Michael Chan, Chris Celio, Steven R. Tannenbaum, John S. Wishnok, and Jongyoon Han. Free-Flow Zone Electrophoresis of Peptides and Proteins in PDMS Microchip for Narrow pI Range Sample Prefractionation Coupled with Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 82(6):2317–2325, 2010. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac9025219.
- [29] Pingli Wang, Lihua Zhang, Yichu Shan, Yongzheng Cong, Yu Liang, Bin Han, Zhen Liang, and Yukui Zhang. Protein separation using free-flow electrophoresis microchip etched in a single step. *Journal of Separation Science*, 33(13): 2039–2044, 2010. ISSN 16159306. doi: 10.1002/jssc.201000162.

- [30] A. M. Raem and P. Rauch. *Immunoassays*. Spektrum Akademischer Verlag (Imprint der Elsevier GmbH), München, 1 edition, 2007. ISBN 9783827416360.
- [31] Robert L. Moritz, Hong Ji, Frédéric Schütz, Lisa M. Connolly, Eugene A. Kapp, Terence P. Speed, and Richard J. Simpson. A Proteome Strategy for Fractionating Proteins and Peptides Using Continuous Free-Flow Electrophoresis Coupled Off-Line to Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 76(16):4811–4824, 2004. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac049717l.
- [32] Mikkel Nissum, Sabine Kuhfuss, Monika Hauptmann, Christian Obermaier, Ute Sukop, Robert Wildgruber, Gerhard Weber, Christoph Eckerskorn, and Johan Malmström. Two-dimensional separation of human plasma proteins using iterative free-flow electrophoresis. *PROTEOMICS*, 7(23):4218–4227, 2007. ISSN 16159853. doi: 10.1002/pmic.200700166.
- [33] Eve F. Fabrizio, Ali Nadim, and James D. Sterling. Resolution of Multiple ssDNA Structures in Free Solution Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 75(19):5012–5021, 2003. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac034326c.
- [34] Thomas Hahn, Ciara K. O’Sullivan, and Klaus S. Drese. Microsystem for Field-Amplified Electrokinetic Trapping Preconcentration of DNA at Poly(ethylene terephthalate) Membranes. *Analytical Chemistry*, 81(8):2904–2911, 2009. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac801923d.
- [35] D.W Bianchi. Circulating Fetal DNA: Its Origin and Diagnostic Potential—A Review. *Placenta*, 25:93–101, 2004. ISSN 01434004. doi: 10.1016/j.placenta.2004.01.005.
- [36] Robert J. Meagher, Jong-In Won, Jennifer A. Coyne, Jennifer Lin, and Annelise E. Barron. Sequencing of DNA by Free-Solution Capillary Electrophoresis Using a Genetically Engineered Protein Polymer Drag-Tag. *Analytical Chemistry*, 80(8):2842–2848, 2008. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac702591t.
- [37] Robert J. Meagher, Jong-In Won, Laurette C. McCormick, Sorin Nedelcu, Martin M. Bertrand, Jordan L. Bertram, Guy Drouin, Annelise E. Barron, and Gary W. Slater. End-labeled free-solution electrophoresis of DNA. *Electrophoresis*, 26(2):331–350, 2005. ISSN 0173-0835. doi: 10.1002/elps.200410219.
- [38] Bowser M. T. Fonslow BR. Optimizing band width and resolution in micro-free flow electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 78(24):8236–8244, 2006. ISSN 0003-2700.
- [39] D. Kohlheyer. *Microfluidic free-flow electrophoresis for proteomics-on-a-chip*. PhD thesis, University of Twente, Enschede, 2008. URL <http://www.worldcat.org/oclc/232540528>.

- [40] Dirk Janasek, Michael Schilling, Joachim Franzke, and Andreas Manz. Isotachophoresis in Free-Flow Using a Miniaturized Device. *Analytical Chemistry*, 78(11):3815–3819, 2006. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac060063l.
- [41] Marco Becker, Christian Budich, Volker Deckert, and Dirk Janasek. Isotachophoretic free-flow electrophoretic focusing and SERS detection of myoglobin inside a miniaturized device. *The Analyst*, 134(1):38, 2008. ISSN 0003-2654. doi: 10.1039/b816717f.
- [42] Stefan Köhler, Stefan Nagl, Stefanie Fritzsche, and Detlev Belder. Label-free real-time imaging in microchip free-flow electrophoresis applying high speed deep UV fluorescence scanning. *Lab on a Chip*, 12(3):458, 2012. ISSN 1473-0197. doi: 10.1039/c1lc20558g.
- [43] Katja Feick. Neuste Technologien im Markt für Lab-on-a-Chip: Mikrofluidik und TAS: Emerging Technologies in Lab-on-a-Chip: Microfluidics and TAS: Report D323. URL <http://www.frost.com/prod/servlet/press-release.pag?docid=26142146>.
- [44] O. Z. Stern. *Electrochem.*, 30(508), 1924.
- [45] Reiner Westermeier and Neil Barnes. *Electrophoresis in practice: A guide to methods and applications of DNA and protein separations*. Wiley-VCH, Weinheim and New York, 3rd edition, 2001. ISBN 9783527303007. URL <http://www.worldcat.org/oclc/46777576>.
- [46] Arne Tiselius. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Transactions of the Faraday Society*, 33:524, 1937. ISSN 0014-7672. doi: 10.1039/tf9373300524.
- [47] Dongqing Li. *Electrokinetics in microfluidics*. Academic, Oxford, 2004. ISBN 0120884445. URL <http://www.worldcat.org/oclc/162129955>.
- [48] L. Puignou M. Diez M.T. Galceran. Comparison of different electroosmotic flow modifiers in the analysis of inorganic anions by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1996(732):167–174.
- [49] Budin Michov. *Elektrophorese: Theorie und Praxis*. W. de Gruyter, Berlin and New York, 1996. ISBN 9783110149944. URL <http://www.worldcat.org/oclc/34309923>.
- [50] Gerhard Weber and Petr Boček. Recent developments in preparative free flow isoelectric focusing. *Electrophoresis*, 19(10):1649–1653, 1998. ISSN 0173-0835. doi: 10.1002/elps.1150191021.

- [51] P. Gebauer and P. Bocek. A new type of migrating zone boundary in electrophoresis: 1. General description of boundary behavior based on electromigration dispersion velocity profiles. *Electrophoresis*, 26(2):453–462, 2005. ISSN 0173-0835. doi: 10.1002/elps.200406168.
- [52] Daniel E. Raymond, Andreas Manz, and H. Michael Widmer. Continuous Separation of High Molecular Weight Compounds Using a Microliter Volume Free-Flow Electrophoresis Microstructure. *Analytical Chemistry*, 68(15):2515–2522, 1996. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac950766v.
- [53] P. G. Righetti. *Isoelectric focusing: Theory, methodology, and applications*. Elsevier Biomedical Press and Sole distributors for the U.S.A. and Canada, Elsevier-North Holland, Amsterdam and New York, 1st edition, 1983. ISBN 0080858805. URL <http://www.worldcat.org/oclc/298132771>.
- [54] Qinggang Wang, Dennis Tolley, David LeFebre, and Milton Lee. Analytical equilibrium gradient methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(3):125–135, 2002. ISSN 1618-2642. doi: 10.1007/s00216-002-1286-y.
- [55] Hans-Dieter Jakubke. *Peptide: Chemie und Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996. ISBN 3827400007. URL <http://www.worldcat.org/oclc/45500427>.
- [56] Chenghao Li. *Strukturanalyse von antibiotischen Peptiden in Lipidmembranen mittels Röntgenreflektivität*. PhD thesis, Georg-August-Universität, Göttingen, 2005.
- [57] E. Gianazza and P. G. Righetti. Size and charge of macromolecules in living systems. *Journal of Chromatography A*, 1980(193):1–8, 1980.
- [58] Olof Vesterberg, Harry Svensson, R. Nevald, V. Frank, J. Brunvoll, E. Bunnenberg, Carl Djerassi, and Ruth Records. Isoelectric Fractionation, Analysis, and Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients. IV. Further Studies on the Resolving Power in Connection with Separation of Myoglobins. *Acta Chemica Scandinavica*, 20:820–834, 1966. ISSN 0904-213X. doi: 10.3891/acta.chem.scand.20-0820.
- [59] S. Fredriksson. *Electro Focusing and Isotachophoresis*. Walter de Gruyter, Berlin, 1977.
- [60] E. Chargaff J.N Davidson D.O. Jordan. *The Nucleic: The physical properties of nucleic acids*. Academic Press, New York, 1 edition, 1955.
- [61] James D. Watson. *Molecular biology of the gene*. Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco, 5 edition, 2003. ISBN 9780805346350. URL <http://www.worldcat.org/oclc/423675724>.



- [62] J.D Watson and F.H.C Crick. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, (171):737–738, 1953. ISSN 0028-0836.
- [63] Kai Bratke, Michael Küpper, Werner Luttmann, and Daniel Myrtek. *Der Experimentator: Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg and Neckar, 3. Aufl. edition, 2008. ISBN 3827420261. URL <http://www.worldcat.org/oclc/255278787>.
- [64] Dr. med. Olav Hagemann. Laborlexikon: e-Journal für Labormedizin (ISSN 1860-966X). URL <http://www.laborlexikon.de>.
- [65] G. KÖHLER and C. MILSTEIN. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517):495–497, 1975. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/256495a0.
- [66] Sefik S. Alkan. Landmark: Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. *Nature Reviews Immunology*, 4(2): 153–156, 2004. ISSN 1474-1733. doi: 10.1038/nri1265.
- [67] Charles Janeway and Kenneth P. Murphy. *Janeway Immunologie*. Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg, 7 edition, 2009. ISBN 3827420474.
- [68] Greta Nölke, Rainer Fischer, and Stefan Schillberg. Production of therapeutic antibodies in plants. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3(7):1153–1162, 2003. ISSN 1471-2598. doi: 10.1517/14712598.3.7.1153.
- [69] Laura Sanz, Belén Blanco, and Luis Álvarez-Vallina. Antibodies and gene therapy: teaching old ‘magic bullets’ new tricks. *Trends in Immunology*, 25 (2):85–91, 2004. ISSN 14714906. doi: 10.1016/j.it.2003.12.001.
- [70] David A. Giljohann and Chad A. Mirkin. Drivers of biodiagnostic development. *Nature*, 462(7272):461–464, 2009. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature08605.
- [71] K. Catt and G. W. Tregear. Solid-Phase Radioimmunoassay in Antibody-Coated Tubes. *Science*, 158(3808):1570–1572, 1967. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.158.3808.1570.
- [72] Eva Engvall and Peter Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9):871–874, 1971. ISSN 00192791. doi: 10.1016/0019-2791(71)90454-X.
- [73] B.K van Weemen and A.H.W.M Schuurs. Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. *FEBS Letters*, 15(3):232–236, 1971. ISSN 00145793. doi: 10.1016/0014-5793(71)80319-8.
- [74] J. R. Crowther. *The ELISA guidebook*. Humana Press, Totowa and NJ, 2001. ISBN 9780896039506. URL <http://www.worldcat.org/oclc/43060501>.

- [75] Helmut Friemel. *Immunologische Arbeitsmethoden: Mit 50 Tabellen*. Fischer, Jena, 4., überarb edition, 1991. ISBN 9783334003824. URL <http://www.worldcat.org/oclc/74899273>.
- [76] Paul Yager, Thayne Edwards, Elain Fu, Kristen Helton, Kjell Nelson, Milton R. Tam, and Bernhard H. Weigl. Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature*, 442(7101):412–418, 2006. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature05064.
- [77] Liangcheng Zhou, Fei Ding, Hao Chen, Wei Ding, Weihua Zhang, and Stephen Y. Chou. Enhancement of Immunoassay’s Fluorescence and Detection Sensitivity Using Three-Dimensional Plasmonic Nano-Antenna-Dots Array. *Analytical Chemistry*, 84(10):4489–4495, 2012. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac3003215.
- [78] Taihua Li, Eun-Jung Jo, and Min-Gon Kim. A label-free fluorescence immunoassay system for the sensitive detection of the mycotoxin, ochratoxin A. *Chemical Communications*, 48(17):2304, 2012. ISSN 1359-7345. doi: 10.1039/c2cc17088d.
- [79] G.H Schenk. *Absorption of Light and Ultraviolet Radiation: Fluorescence and Phosphorescence Emission*. Instrumentation Series. Allyn & Bacon, Incorporated, Boston, 1973. ISBN 9780205037209.
- [80] Fritz Kurt Kneubühl and Markus Werner Sigrist. *Laser: Mit zahlreichen Tabellen*. Teubner-Studienbücher : Physik. Teubner, Stuttgart, 3 edition, 1991. ISBN 9783519230328.
- [81] J. Höbel. *Spektralaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenz-Detektion mit abstimmbarer UV-Strahlung in der Kapillarzonenelektrophorese*. PhD thesis, Universität, Bielefeld, 1998.
- [82] Wellington Pham, Zdravka Medarova, and Anna Moore. Synthesis and Application of a Water-Soluble Near-Infrared Dye for Cancer Detection Using Optical Imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 16(3):735–740, 2005. ISSN 1043-1802. doi: 10.1021/bc049700+.
- [83] Martin Link, Philipp Schulze, Detlev Belder, and Otto S. Wolfbeis. New diode laser-excitable green fluorescent label and its application to detection of bovine serum albumin via microchip electrophoresis. *Microchimica Acta*, 166(1-2):183–188, 2009. ISSN 0026-3672. doi: 10.1007/s00604-009-0169-8.
- [84] Britta Walowski, Wilhelm Hüttner, and Hainer Wackerbarth. Generation of a miniaturized free-flow electrophoresis chip based on a multi-lamination technique—isoelectric focusing of proteins and a single-stranded DNA fragment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(8):2465–2471, 2011. ISSN 1618-2642. doi: 10.1007/s00216-011-5353-0.

- [85] H. Mühlberger. *Mikrofluidische CE-Systeme aus Polymeren mit elektrischer Detektion für Life-Science-Anwendungen: Wissenschaftliche Berichte*. FZKA, 2007.
- [86] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, and D. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148):802–805, 1994. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.8303295.
- [87] Huanchun Cui, Keisuke Horiuchi, Prashanta Dutta, and Cornelius F. Ivory. Isoelectric Focusing in a Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Chip. *Analytical Chemistry*, 77(5):1303–1309, 2005. ISSN 0003-2700. doi: 10.1021/ac048915+.
- [88] Frederick H. Silver, Joseph LiBrizzi, George Pins, Ming-Che Wang, and Dominick Benedetto. Physical properties of hyaluronic acid and hydroxypropyl-methylcellulose in solution: Evaluation of coating ability. *Journal of Applied Biomaterials*, 5(1):89–98, 1994. ISSN 1045-4861. doi: 10.1002/jab.770050111.
- [89] Sigma-aldrich. Albumin from bovine serum, 16.08.2013. URL <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a2153?lang=de&region=DE>.
- [90] Paul Kremer, Mahmoudreza Fardanesh, Reinhard Ding, Maria Pritsch, Saida Zoubaa, and Eva Frei. Intraoperative Fluorescence Staining of malignant Brain Tumors using 5-Aminofluorescein-labeled Albumin. *Neurosurgery*, 64:53–61, 2009. ISSN 0148-396X. doi: 10.1227/01.NEU.0000335787.17029.67.
- [91] John L. Moreland, Apostol Gramada, Oleksandr V. Buzko, Qing Zhang, and Philip E. Bourne. The Molecular Biology Toolkit (MBT): A Modular Platform for Developing Molecular Visualization Applications. *BMC Bioinformatics*, 6(1):6–21, 2005. ISSN 14712105. doi: 10.1186/1471-2105-6-21.
- [92] Santa Cruz Biotechnology, Inc. Protein L-Agarose Immunoprecipitation Reagent: sc-2336, 04.08.2013. URL <http://datasheets.scbt.com/sc-2336.pdf>.
- [93] Sigma-aldrich. Albumin–fluorescein isothiocyanate conjugate, 16.08.2013. URL <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp00887.pdf>.
- [94] Life Technologies GmbH. Avidin and NeutrAvidin™ Biotin-Binding Proteins and Conjugates, 18.08.2013. URL <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp00887.pdf>.
- [95] P. Stothard. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques. The International Journal of Life Sciences Methods*, 2000(28):1102–1104. URL [http://www.bioinformatics.org/sms2/protein\\_iep.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_iep.html).

## Literaturverzeichnis

- [96] IBA Biologics GmbH. Strep-tag®: The leading affinity tag in recombinant protein technology, 28.08.2013. URL [www.iba-lifesciences.com/strep-tag.html](http://www.iba-lifesciences.com/strep-tag.html).
- [97] M. Chalfie and S.R Kain. *Methods of Biochemical Analysis, Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols*. Wiley, 2005. ISBN 9780471739487.
- [98] Agrisera Antibodies. Information about IgG antibodies, 30.08.2013. URL <http://www.agrisera.com/en/info/igg.html>.
- [99] E. Beckert, R. Eberhardt, Oliver Pabst, Falk Kemper, Zhe Shu, Andreas Tünnermann, Jolke Perelaer, Ulrich Schubert, Holger Becker, and Bonnie L. Gray. SPIE Proceedings 2013: Inkjet printed structures for smart lab-on-chip systems. pages 86150E–86150E–10.
- [100] Frantisek Foret, Jörg Kutter, Reinhild Beyreiss, Stefan Ohla, Stefan Nagl, and Detlev Belder. Label-free analysis in chip electrophoresis applying deep UV fluorescence lifetime detection. *Electrophoresis*, 32(22):3108–3114, 2011. ISSN 0173-0835. doi: 10.1002/elps.201100204.
- [101] Stefan Jezierski, Detlev Belder, and Stefan Nagl. Microfluidic free-flow electrophoresis chips with an integrated fluorescent sensor layer for real time pH imaging in isoelectric focusing. *Chemical Communications*, 49(9):904, 2013. ISSN 1359-7345. doi: 10.1039/c2cc38093e.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich beim Entstehen dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Markus Sauer für die Möglichkeit meiner Promotion an der Universität Bielefeld und die unkomplizierte, spontane und immer unglaublich freundliche Hilfestellung, wann immer ich sie brauchte.

Bei Prof. Dr. Thomas Huser möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Korreferates bedanken.

Ein großer Dank geht an Dr. Alexander Egner, Prof. Dr. Wolfgang Viöl und Prof. Dr. Gerd Marowsky für die Möglichkeit, am Laser-Laboratorium Göttingen e.V. meine Promotion anzufertigen.

Dr. Hainer Wackerbarth danke ich sehr für die gute Betreuung, für seine Geduld und sein Verständnis, dass er immer ein offenes Ohr hatte und für die hilfreichen Gespräche und Diskussionen.

Besonders dankbar bin ich Dr. Volker Beushausen für eine stets offene Tür, die ständige Diskussionsbereitschaft und seine herzliche und fürsorgliche Art, die ich immer sehr geschätzt habe und nie vergessen werde.

Vielen Dank an Dr. Ralf Müller, Jens Müller, Frank Rotter, Christian Salb, Dominik Niedenzu, Christine Martino, Dr. Alexander Grosch, Dr. Constantin Christou, Wilhelm Hüttner und der ganzen Abteilung *Photonische Sensorik* für die vielen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Gespräche und Diskussionen.

Andreas Spata, Stefan Scholz und Alexander Göhmann danke ich für die Konstruktion und Herstellung benötigter Bauteile und die Abbildungen mit Inventor.

Vielen dank an Dr. Joachim Bertram für die Unterstützung bei biologischen Fragestellungen und der Bereitstellung diverser biologischer Proben.

Weiterer Dank geht an unsere Projektpartner für die gute Zusammenarbeit und die Diskussionen der Ergebnisse.

Vielen Dank an Dr. Erhard Kühnle, Dr. Mark Schüttpelz und meinen Vater für das Korrekturlesen der Manuskripte und die vielen konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Der Arbeitsgruppe *Biomolekulare Photonik* und besonders Reinhild Pätzmann möchte ich dafür danken, dass sie mich als externe Doktorandin so freundlich aufgenommen haben. Vielen Dank für die Hilfsbereitschaft und die herzliche Atmosphäre.

Herzlichen Dank an Dr. Ronja Gärtner für die vielen Gespräche, die schöne Zeit und ihre Freundschaft.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Göttingen, im Oktober 2013

---

Britta Walowski



