

Entwicklung einer Enzymimmunoelktrode  
zur Bestimmung von Atrazin in Wasser

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

vorgelegt von

Iris Hartmann  
geboren in Mainz

Mainz 2001

Dekan: Prof. Dr. H. Meier

Tag der mündlichen Prüfung : 21.12.2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1996 bis Juli 2001 am Institut für Physikalische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität durchgeführt.

1. Einleitung und Zielsetzung .....	1
Theoretischer Teil:	
2. Biosensoren .....	3
2.1 Historische Entwicklung .....	4
2.1.1. Glucose Biosensor .....	4
2.1.2. Bananatrode .....	5
2.1.3. Manan-Biosensor .....	6
2.2 Genereller Aufbau eines Biosensors .....	6
2.2.1 Der Analyt .....	7
2.2.2 Die biologische Komponente .....	7
2.2.2.1 Enzyme .....	7
2.2.2.2 Antikörper .....	9
2.2.2.3 Tier- und Pflanzengewebe .....	9
2.2.2.4 Mikroorganismen .....	10
2.2.2.5 Nucleinsäuren .....	10
2.2.2.6 Rezeptoren .....	10
2.2.2.7 Molecular Imprinted Polymer (MIP) .....	11
2.2.3 Immobilisierung der biologischen Komponente .....	11
2.2.3.1 Adsorption .....	11
2.2.3.2 Mikroverkapselung .....	12
2.2.3.3 Einbettung in Polymere .....	12
2.2.3.4 Quervernetzung .....	12
2.2.3.5 Kovalente Bindung .....	13
2.2.4 Signalwandler .....	13
2.2.4.1 Elektrochemische Signalwandler .....	14
2.2.4.1.1 Potentiometrische Detektion .....	14
2.2.4.1.2 Voltametrie .....	14
2.2.4.1.3 Konduktometrie .....	15
2.2.4.2 Feldeffekttransistoren (FET) .....	15
2.2.4.3 Optische Signalwandler .....	16
2.2.4.4 Piezoelektrische Kristalle .....	17
2.2.4.5 Methoden mit akustischen Wellen .....	18
2.2.4.6 Thermische Methoden .....	18
3. Antikörper .....	19
3.1 Immunglobuline .....	19
3.2 Kreuzreaktivität .....	22
3.3. Produktion monoklonaler Antikörper .....	23
3.4 Der monoklonale Antikörper K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> .....	26
3.5. Immunoassay .....	27
3.5.1 Unterscheidung der Immunoassays .....	27
3.5.1.1 Homogene Immunoassays .....	28
3.5.1.2 Heterogene Immunoassays .....	28
3.5.2 Auswertung von Immunoassay-Daten .....	31
3.5.2.1. 4-Parameter-Gleichung nach Rodbard .....	31
3.5.2.2 Auswertung nach Normalisierung der Absorptionswerte auf % B/B <sub>0</sub> -Werte .....	32
3.5.2.3 Linearisierung mittels logit-log-Transformation .....	33
3.5.3 Reproduzierbarkeit, Nachweisgrenze und Sensitivität .....	34
3.5.4 Vor und Nachteile von Immunochemischen Analysenmethoden .....	36
4. pH Messung .....	38
4.1 Geschichte der pH-Messung .....	38
4.2 Säure-Base Theorien: .....	38
4.2.1 Arrhenius Theorie: .....	38
4.2.2 Brønstedtsche Theorie .....	39

4.2.3 Lewissche Theorie .....	40
4.2.4 pH-Wert.....	40
4.2.5 Elektrolyte .....	40
4.2.5.1 Wasser .....	40
4.2.5.2 Das Ionenprodukt des Wassers.....	41
4.2.6 Nernstsches Gesetz .....	42
4.2.6.1 Aktivitätskoeffizienten .....	42
4.2.6.2 Elektrochemisches Potential.....	42
4.2.7 Die Glaselektrode.....	43
4.2.8 pH Indikatoren.....	45
<b>5. Das Herbizid Atrazin .....</b>	<b>48</b>
<b>6. <math>\beta</math>-Lactamase I (EC 3.5.2.6) .....</b>	<b>54</b>
6.1 Struktur von $\beta$ -Lactamase .....	54
6.2 Antibiotika .....	55
6.2.1 Allgemeine Eigenschaften .....	55
6.3 Reaktion der $\beta$ -Lactamase .....	57
6.4 Kinetische Parameter.....	57
6.5 Inhibitoren .....	58
6.6 Allgemeine Eigenschaften der $\beta$ -Lactamase .....	58
6.7 Anwendungsmöglichkeiten von $\beta$ -Lactamase.....	58
<b>7. Praktischer Teil: .....</b>	<b>59</b>
7.1 Einleitung: .....	59
7.2 Enzymkinetik.....	59
7.2.1 Diskussion der Ergebnisse .....	61
7.3 Tracersynthesen .....	63
7.3.1. Synthese des iPr/Cl/C6-Tracers: .....	63
7.3.2. Darstellung der Di-Chlorsimazin- und Dichloratrazin-Tracer.....	67
7.3.3 Untersuchungen zum Einfluß der Kopplung auf die Kinetik der Enzymreaktion.....	70
7.3.4 Zusammenfassung und Diskussion.....	73
7.4 Der Immunoassays unter Verwendung des iPr/Cl/C6-Tracer .....	74
7.4.1 Optimierung des Ablaufs des Immunoassays mit dem iPr/Cl/C6-Tracer.....	74
7.4.2 Zusammenfassung und Diskussion.....	78
7.5. Immunoassay unter Verwendung des Di-Chloratrazin-Tracer .....	80
7.5.1 Optimierung des Assaysablaufs .....	80
7.5.2 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse: .....	83
7.6. Immunoassay unter Verwendung des Di-Chlorsimazin-Tracer.....	84
7.6.1 Optimierung des Assayablaufs.....	84
7.6.2. Zusammenfassung und Diskussion.....	86
7.7. Optimierung des Immunoassays für die Übertragung auf Polystyrolmikropartikel unter Verwendung des iPr/Cl/C6-Tracer.....	87
7.7.1 Optimierung des Immunoassays unter Verwendung des iPr/Cl/C6-Tracer .....	87
7.7.2 Einfluß von Huminstoffen auf den Immunoassay.....	90
7.7.3. Zusammenfassung und Diskussion.....	94
7.8 Übertragung des Immunoassays auf Polystyrolmikropartikel.....	95
7.8.1 Einleitung .....	95
7.8.2. Vorbereitende Untersuchungen.....	95
7.8.2.1. Zentrifugation der Mikropartikel .....	95
7.8.2.2. Adsorption von Antikörpern an die Oberfläche der Polystyrolmikropartikel (PSMP).....	96
7.8.2.3 Optimierung des Immunoassays unter Verwendung der Polystyrolmikropartikel.....	99
7.8.3. Zusammenfassung und Diskussion .....	105
7.9 Einsatz der pH-Elektrode .....	106
7.9.1 Bestimmung der Atrazinkonzentration mit der pH-Elektrode.....	106
7.9.2. Zusammenfassung und Diskussion.....	112
7.10 Allgemeine Fehlerbetrachtung:.....	113

8. Diskussion der Ergebnisse.....	115
8.1 Entwicklung des Immunoassays in Mikrotiterplatten.....	116
8.2 Übertragung des Immunoassays auf die Polystyrolmikropartikel.....	119
8.3 Einsatz der pH-Elektrode als Signalwandler im Immunoassay mit PSMP.....	121
9. Ausblick.....	126
10. Zusammenfassung.....	127
11. Anhang.....	129
12. Literatur.....	133

## Abkürzungsverzeichnis:

A	Absorption
$A_0$	Absorption der Nullprobe
$A_{\ddot{U}}$	Absorption der Überschußprobe
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
$B/B_0$	Normierte Absorption
ELISA	Enzymatischer Festphasen Immunoassays
EIA	Enzymimmunassays
$F_{ab}$	antigen binding fragment
$F_c$	crystallizable fragment
FET	Feldeffekttransistor
FIA	Fluoreszenzimmunoassay
FIIA	Fließinjektions-Immunoanalyse
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitchromatographie
$I_{50}$	Testmittelpunkt, 50%B/B <sub>0</sub>
IA	Immunoassay
IgG	Immunoglobulin G
iPr	Isopropyl-Rest
iPr/Cl/C6	2-Chlor-4-(isopropylamino)-6-[(1-carboxypent-5-yl)amino]-s-Triazin
$K_4E_7$	monoklonaler Antikörper gegen Atrazin
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
M	mol/L
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
PBS	Phosphat buffered saline
PBST	Phosphat buffered saline mit Tween 20
POD	Peroxidase
PSMP	Polystyrolmikropartikel
S	Standardabweichung
SPE	Festphasenextraktion
VK	Variationskoeffizient

## 1. Einleitung und Zielsetzung

Durch die stetig wachsende Bevölkerung ist es in den vergangenen Jahrzehnten notwendig geworden, die Nahrungsversorgung durch den Einsatz von Pestiziden zu gewährleisten. Herbizide stellen mit 50% den größten Anteil an den ausgebrachten Wirkstoffen.

Durch den Einsatz der Herbizide sind deutliche Ertragssteigerungen zu erreichen, aber die Herbizide werden nicht zu 100% von der Pflanze aufgenommen und können so im Boden verbleiben oder durch Regenfälle in das Oberflächenwasser eingetragen werden. Ein Teil der Wirkstoffe kann von der Oberfläche der Blätter verdunsten und bis in die Atmosphäre gelangen. Innerhalb der Atmosphäre sind Verbreitungen bis in Gebiete möglich, die weit vom Ausbringungsort gelegen sind. So sind schon in den 70er Jahren Untersuchungen zum Transport von DDT durch die Atmosphäre durchgeführt worden [1]. In diesen Untersuchungen konnte DDT bis in die Polarregionen nachgewiesen werden.

Die seit dem 1.4.1991 in Kraft getretene Trinkwasserverordnung schreibt vor, daß der Gesamtgehalt an Pflanzenschutzmitteln einen Wert von  $0.5\mu\text{g/L}$  und der Gehalt an Einzelsubstanzen einen Wert von  $0.1\mu\text{g/L}$  nicht überschreiten soll.

Triazine stellen einen großen Anteil an der Gesamtmenge an ausgebrachten Herbiziden dar. Vor allem Atrazin wurde bis zu seinem Verbot 1991 in großen Mengen verwendet. So wurde die jährlich ausgebrachte Menge mit  $70000\text{ t/Jahr}$  angegeben [2]. Obwohl Atrazin 1991 verboten wurde, konnte es bis 1996 kontinuierlich mit bis zu  $0.2\mu\text{g/L}$  im Rhein oder in der Elbe nachgewiesen werden [3]. Auch im Jahr 2001, 10 Jahre nach dem Verbot, konnte Atrazin und sein Abbauprodukt Desethylatrazin in einem Brunnen in Ebersbach bei München in Konzentrationen von  $0.05\mu\text{g/L}$  und  $0.12\mu\text{g/L}$  nachgewiesen werden [3]. Auch Atrazin unterliegt einem Ferntransport. So konnte Atrazin in emissionsfernen Schweizer Bergseen oder im Royal National Park in Michigan nachgewiesen werden [4,5].

Um eine Einhaltung der Grenzwerte zu gewährleisten, ist eine kontinuierliche Überwachung der Trinkwasserqualität nötig. Als Standardmethoden werden HPLC und GC/MS zur Bestimmung von Pflanzenschutzmitteln im Wasser verwendet [6-8]. Diese Standardmethoden erfordern, aufgrund eines Aufkonzentrierungsschrittes, meist Probevolumina von  $500\text{mL}$ . Damit können keine Untersuchungen von natürlichen Wässern durchgeführt werden, welche nur in kleinen Volumina zur Verfügung stehen, wie z.B. Wolken- oder Nebelproben. Deswegen ist die Entwicklung von Screeningmethoden für kleine Volumina eine Aufgabe in der Analytischen Chemie.

Der Einsatz von immunologischen Testverfahren ist in der Medizin ein etabliertes Verfahren. Diese Methoden nutzen die spezifische Reaktion eines Antikörpers mit seinem Antigen, dem Analyten, zur quantitativen und qualitativen Analyse aus. Solche Testverfahren benötigen ein Probenvolumen von 50-100 $\mu$ L.

In den letzten Jahren haben solche immunologischen Testverfahren Einzug in die Umweltanalytik gefunden [9-12]. Der Einsatz solcher Testverfahren erfordert die Verfügbarkeit hochaffiner Antikörper zum Nachweis von Umweltschadstoffen. Der Nachweis der gebundenen Analytmenge erfolgt über den Einsatz eines Tracers. Oft ist der Tracer ein Analytderivat gekoppelt mit einem Enzym. Es können unterschiedliche Enzyme zum Einsatz kommen. Meistens werden Enzyme ausgewählt, welche eine Reaktion katalysieren, die eine Farbänderung in einer Substratlösung zur Folge hat. Die Detektion erfolgt dann mittels eines Photometers. In [13] wird eine Übersicht über bereits entwickelte Immunoassays zur Bestimmung von Atrazin im Wasser gegeben.

In den letzten Jahrzehnten sind viele Biosensoren zur Bestimmung von Schadstoffen im Wasser entwickelt worden. Die meisten Systeme erfordern den Einsatz von gut ausgebildetem Personal und sind mit komplizierter Technik verbunden. In [14] wird eine Übersicht über einige bereits entwickelte Biosensoren, die Antikörper zur Bestimmung von Atrazin in Wasser verwenden, gegeben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es ein Biosensor-System zu entwickeln, welches die Bestimmung von Atrazin in Wasserproben unter Ausnutzung der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion ermöglichte. Es sollte ein einfaches System sein, das auch in einem Labor ohne spezielle Ausrüstung zur Ausführung von Immunoassays durchgeführt werden kann. Es wurde daher zuerst nach einem Enzym gesucht, welches eine Reaktion katalysiert, die auch ohne Photometer detektiert werden kann. Es kam das Enzym  $\beta$ -Lactamase in Frage, welches die Umwandlung von Penicillin G in Penicillinsäure katalysiert. Diese Reaktion ist mit einem pH-Meter zu verfolgen. Dann mußte untersucht werden, ob eine Kopplung des Enzyms an das Analytderivat erfolgen kann. Der nächste Schritt war der Einsatz dieses gekoppelten Tracers in einem konventionellen Immunoassay, um die Eigenschaften des neuen Immunoassays auszutesten. Danach sollte die Übertragbarkeit des Immunoassays auf eine andere feste Phase getestet werden, damit der Nachweis der Enzymreaktion an eine handelsübliche pH-Elektrode gekoppelt werden kann. Als feste Phase wurden Polystyrolmikropartikel ausgewählt. Als Endziel stand die Bestimmung von Atrazin in Wasser mit der entwickelten Immuno-elektrode.

## 2. Biosensoren

In den letzten Jahrzehnten hat die Entwicklung in dem Bereich der Biosensoren gewaltige Fortschritte gemacht. In viele Bereichen der Analytik können Biosensoren eingesetzt werden, so z.B. in der Medizin, in der Kontrolle von Lebensmitteln und in der Umweltanalytik. Es existiert eine Vielzahl von Übersichtsartikeln und Büchern, die sich mit den unterschiedlichen Bereichen in der Biosensorik beschäftigen, z.B. [15-24].

Definition:

Unter einem Biosensor versteht man eine Einheit, die eine selektive biochemische Reaktion in ein analytisch verwertbares Signal überführt [25].

Ein Biosensor sollte folgende Eigenschaften haben:

- Selektivität
- keine Störung durch Matrixbestandteile
- möglichst kein Aufreinigungsschritt oder Aufkonzentrierungsschritt
- Signal soll genau und reproduzierbar sein
- Meßbereich soll dem Konzentrationsbereich der zu untersuchenden Substanz entsprechen
- kalibrierfähig
- unempfindlich gegenüber Temperaturschwankungen, elektrischem Rauschen
- Produktsicherheit, keine Kontamination der Probe
- kurze Ansprechzeiten
- kurze Erholungszeit
- lange Lebensdauer
- robust
- geringer Wartungsbedarf
- billig
- einfache Handhabung

Viele dieser Eigenschaften können durch geeignete Wahl der Komponenten eines Biosensors verwirklicht werden. Die Selektivität ist durch geeignete Auswahl der biochemischen Komponente nicht schwierig zu verwirklichen. Ein großes Problem können Matrixbestandteile sein. Oft ist es bei Proben so, daß sie Stoffe enthalten, welche die biologische Komponente

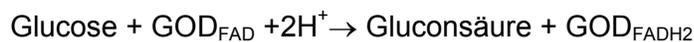
inaktivieren. In solchen Fällen muß eine Aufreinigung der Probe erfolgen. Ein genaues und reproduzierbares Signal ist eine Grundvoraussetzung für eine analytische Meßmethode. Eine Kalibrierung sollte möglich sein, da der Biosensor für die quantitative Messung von Analyten eingesetzt werden soll. Eine Temperaturkonstanz sollte wegen der biologischen Komponente eingehalten werden, da z.B. bei der Verwendung von Enzymen, eine Denaturierung bei zu hoher Temperatur oder eine Veränderung in der Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymreaktion erfolgen kann. Es kann auch zu einer Temperaturabhängigkeit des Detektorsignales kommen, z.B. bei einer pH-Messung muß auf Temperaturkonstanz geachtet werden. Kurze Ansprechzeiten und Erholungszeiten sind wichtig für die praktische Anwendbarkeit eines Biosensors. Sind diese Zeiten zu lange, wird die Messung einer Probe unzuweckmäßig verlängert. Die Lebensdauer hängt meist von der biologischen Komponente des Biosensors ab. Werden Antikörper verwendet, ist es oftmals schwierig, den Analyten von dem Antikörper wieder zu entfernen, da die Methoden, um die Antigen-Antikörper-Bindung wieder zu lösen, oft drastische Bedingungen erfordern und damit den Antikörper in Mitleidenschaft ziehen können. Die folgenden Kapitel sollen einen kurzen Überblick über die verschiedenen Elemente eines Biosensors liefern.

## 2.1 Historische Entwicklung

### 2.1.1. Glucose Biosensor

Der erste Biosensor, eine Enzymelektrode, wurde von Clarke und Lyons (1962) beschrieben [16]. Dieser Biosensor war ein Glucose-Sensor, der die Reaktion der Glucoseoxidase (GOD) von Glucose zu Gluconsäure verfolgte. In diesem Sensor wurde Sauerstoff als Oxidationsmittel verwendet. Der Verbrauch des Sauerstoffs wurde mittels einer elektrochemischen Reduktion an einer Platinelektrode verfolgt.

Glucoseoxidase enthält zwei Moleküle Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD). Diese sind ein Cofaktor des Enzyms und verantwortlich für die Redoxeigenschaften [26]. Glucoseoxidase reagiert nach folgenden Gleichungen:



Der Aufbau des Sensors wurde wie folgt realisiert: zwischen der Platin-Katode und der Silber-Anode wurde eine Spannung von  $-0.7\text{V}$  angelegt. Diese reicht aus, um den Sauerstoff zu

reduzieren. Der gemessene Zellstrom ist proportional der Sauerstoffkonzentration. Je weniger Sauerstoff vorhanden ist, um so geringer ist der gemessene Strom.

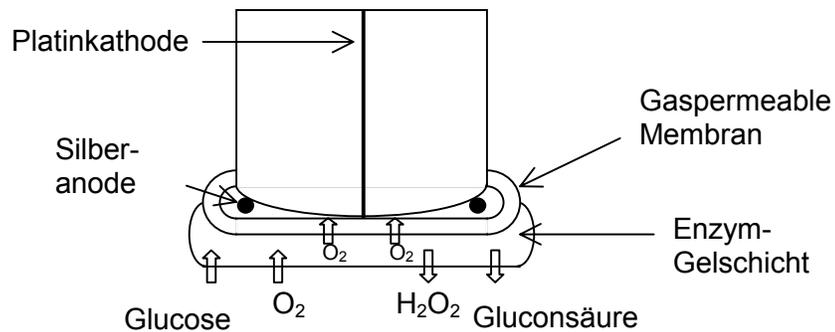


Abb. 2-1 Schematischer Aufbau eines Glucosesensors, verändert nach [17]

### 2.1.2. Bananatrode

Einer der ersten Biosensoren, die Gewebe verwendeten war die sogenannte „Bananatrode“. Mit diesem Biosensor wird die Konzentration von Dopamin bestimmt.

Bananen, wie auch Auberginen, Äpfel, Gurken und Pilzgewebe enthalten das Enzym Polyphenoloxidase (PPO), welches die Oxidation von Molekülen katalysiert, die eine Katecholgruppe enthalten.

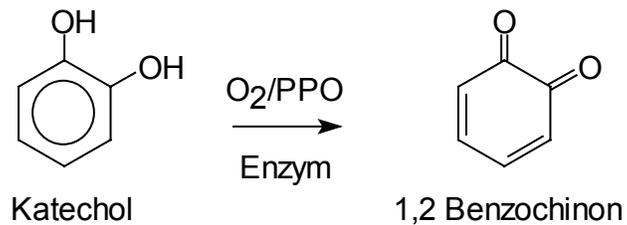


Abb. 2-2 Reaktion des Enzyms PPO.

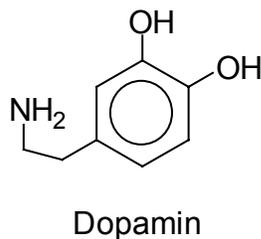


Abb. 2-3 Strukturformel von Dopamin.

Dopamin ist ein Katecholabkömmling. Das Enzym Polyphenoloxidase katalysiert die Oxidation der Dihydroxyform zu dem Chinon unter Verwendung von Sauerstoff. Die elektrochemische Reduktion des Chinons zurück zur Dihydroxyform erzeugt einen Strom, der proportional zur ursprünglichen Dopaminkonzentration ist.

Um die Dopaminkonzentration zu messen, wird ein Brei aus Banane, Graphitpulver und flüssigem Paraffin hergestellt. Der Verbrauch des Sauerstoffs wird mit einer Sauerstoffelektrode gemessen [27].

### 2.1.3. Manan-Biosensor

Die erste Bioaffinitätselektrode war ein Biosensor mit Concanavalin A als Bioaffinitätsmolekül zur Bestimmung des Zuckers Manan. Concanavalin A wurde kovalent auf einer Polyvinylchloridmembran, welche an einem Platindraht befestigt war, fixiert. Die Abhängigkeit des Potentials der Concanavalin-Elektrode von der Manan-Konzentration wurde gegen eine Silber/Silberchlorid-Elektrode als Referenz bestimmt. Mit diesem Biosensor konnten Konzentrationen von Manan bis 0.1mg/mL gemessen werden [28].

## 2.2 Genereller Aufbau eines Biosensors

Ein Biosensor besteht aus 4 Elementen.

1. Der Analyt.
2. Die biologische Komponente
3. Der Signalwandler
4. Der Signalprozessor

Abbildung 2-4 zeigt die schematische Anordnung der Biosensorkomponenten.

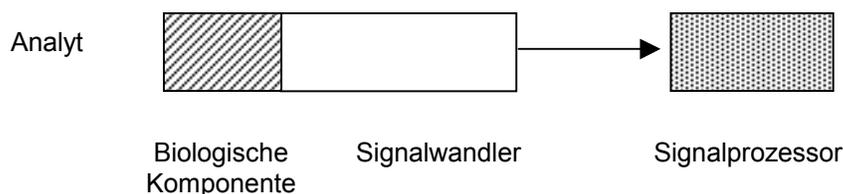


Abb. 2-4 Schematische Darstellung eines Biosensors.

In den folgenden Kapiteln soll kurz auf die einzelnen Komponenten eingegangen werden.

### 2.2.1 Der Analyt

Als Analyt kann nahezu jedes Molekül eingesetzt werden. Voraussetzung ist, daß die biologische Komponente den Analyten umsetzen kann oder eine Reaktion katalysiert, die der Konzentration des Analyten proportional ist.

### 2.2.2 Die biologische Komponente

Die wichtigste Eigenschaft der biologischen Komponente ist die hohe Spezifität zum Analyten, so daß Interferenzen mit anderen Substanzen vermieden werden.

Die biologische Komponente kann einmal eine Reaktion katalysieren (Enzyme) oder sie kann selektiv den Analyten binden (Bioaffinitätsmoleküle, z.B. Antikörper).

#### 2.2.2.1 Enzyme

Viele Enzyme, die in Biosensoren eingesetzt werden, katalysieren Reaktionen, die Oxidationen oder Reduktionen beinhalten. Die Detektion erfolgt meist elektrochemisch.

Der Katalysemechanismus kann in vielen Fällen durch das nachfolgende Schema beschrieben werden:



S Substrat; E Enzym; ES Enzym-Substrat-Komplex; P Produkt

Die Kinetik einer solchen Enzymreaktion ist wichtig bei der Entwicklung eines Biosensors, da nur bei genügend schnellem Umsatz ein ausreichendes Signal zu erwarten ist. Bildungsrate und Zerfallsrate des Enzym-Substrat-Komplexes können durch folgende Gleichungen beschrieben werden:

$$\text{Komplexbildungsrate} = k_1[S][E] \quad (2)$$

$$\text{Komplekzerfallsrate} = k_2[ES] + k_{-1}[ES] \quad (3)$$

Geht man von einem steady state Gleichgewicht aus, dann ist die Komplexbildungsrate gleich der Komplexzerfallsrate:

$$k_1[S][E] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (4)$$

Ist  $[E_0]$  die gesamte Enzymkonzentration erhält man mit  $[E_0] = [E] + [ES]$

$$k_1[S][E_0] - k_1[S][ES] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (5)$$

Aufgelöst nach  $[ES]$  ergibt sich:

$$[ES] = \frac{k_1[E_0][S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} \quad (6)$$

Setzt man die Michaelis-Konstante  $K_M$  ein mit  $K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$  folgt:

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (7)$$

Die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit  $V$  wird durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben:

$$V = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

Ein Beispiel für einen Enzymbiosensor ist der in Kapitel 2.1.1 erwähnte Glucose-Biosensor.

Vorteile bei der Verwendung von Enzymen sind:

- Sie binden selektiv das Substrat.
- Sie besitzen katalytische Aktivität, die die Nachweisempfindlichkeit erhöht, da von einem Enzymmolekül mehrere Substratmoleküle umgesetzt werden können und so eine Verstärkung des Signals erfolgt.
- Sie haben kurze Ansprechzeiten.

Nachteile bei der Verwendung von Enzymen sind:

- Sie sind in der Regel teuer.
- Oft verlieren sie Aktivität, wenn sie auf einem Signalwandler immobilisiert werden.
- Sie tendieren zu einem Verlust der Aktivität aufgrund von Deaktivierung.

### 2.2.2.2 Antikörper

Neben Enzymen können auch Antikörper verwendet werden [14,29-33].

Ein Antigen (Ag) kann, wenn es in einen Organismus eindringt, eine Immunantwort des Immunsystems auslösen. Das Immunsystem bildet dann spezifische Antikörper (Ak) gegen das Antigen. Durch nachfolgende biochemische Reaktionen können so Fremdkörper aus dem Organismus entfernt werden.

Die Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes Ak-Ag durch die Antigen-Antikörper-Reaktion läßt sich wie folgt schreiben:



$$K = \frac{[\text{Ak} - \text{Ag}]}{[\text{Ak}][\text{Ag}]} \quad (10)$$

Die Affinitätskonstante K liegt normalerweise bei  $10^6$  L/mol. Für eine bestimmte Konzentration von Antikörper ist das Verhältnis von freiem zu gebundenem Antigen im Gleichgewicht quantitativ mit der Gesamtkonzentration an Antigen verknüpft. Wird ein Antikörper als biologische Komponente auf dem Transducer immobilisiert und die Antigen-Antikörper-Reaktion ist mit dem Meßsignal verknüpft, spricht man von Immunosensoren.

Vorteile bei der Verwendung von Antikörpern als biologische Komponente sind:

- Antikörper sind selektiv.
- Sie sind sensitiv.
- Sie bilden eine starke Bindung zum Antigen aus.

Nachteile bei der Verwendung von Antikörpern als biologische Komponente sind:

- Sie haben keinen katalytischen Effekt.
- Es können Kreuzreaktivitäten zu strukturell ähnlichen Molekülen auftreten.
- Sie sind oft teuer.

### 2.2.2.3 Tier- und Pflanzengewebe

Tier- und Pflanzengewebe können auch als biologische Komponente eingesetzt werden. Sie bedürfen nur eines geringen Aufwandes an Präparation und enthalten eine Vielzahl von Enzymen. Durch diese unterschiedlichen Enzyme kann ein Verlust an Sensitivität auftreten [15]. Ein Beispiel für die Verwendung von Gewebe in einem Biosensor ist die in Kapitel 2.1.2 erwähnte „Bananatrode“.

Vorteile bei der Verwendung von Gewebe sind:

- Die Enzyme sind in ihrer natürlichen Umgebung erhalten, dadurch wird die Enzymaktivität stabilisiert.
- Sie können eingesetzt werden, wenn gereinigte Enzyme nicht arbeiten.
- Sie sind billiger als gereinigte Enzyme.

Nachteil bei der Verwendung von Gewebematerial ist:

- Aufgrund der Vielzahl der enthaltenen Enzyme kann das einzelne Enzym an Selektivität verlieren.

#### 2.2.2.4 Mikroorganismen

Mikroorganismen spielen eine große Rolle bei industriellen Prozessen, z.B. beim Bierbrauen oder in der Pharmaindustrie [34].

Vorteile bei der Verwendung von Mikroorganismen sind:

- Sie sind eine billigere Quelle für Enzyme als isolierte Enzyme.
- Sie sind weniger sensitiv gegenüber Inhibierung durch gelöste Komponenten und toleranter gegenüber pH Veränderungen.
- Sie haben längere Lebensdauern.

Nachteile bei der Verwendung von Mikroorganismen sind:

- Sie haben längere Ansprechzeiten.
- Sie haben längere Regenerierungszeiten.
- Sie enthalten viele Enzyme, wodurch ein Verlust an Selektivität auftreten kann.

#### 2.2.2.5 Nucleinsäuren

Nucleinsäuren arbeiten ähnlich wie Antikörper. Aufgrund ihrer spezifischen Basenpaarung können sie in Zellen Veränderungen in den Genen feststellen. Sie werden eingesetzt, um genetische Erkrankungen oder Krebs zu diagnostizieren [15].

#### 2.2.2.6 Rezeptoren

Neurotransmitter und hormonelle Rezeptoren sind körpereigene Biosensoren. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor hat ein physiologisches Signal zur Folge. Es können sich z.B. Ionenkanäle öffnen oder Enzyme aktiviert werden. Diese Signale können dann detektiert werden.

Eine Eigenschaft der Rezeptoren ist, daß sie nicht nur mit dem Analyten reagieren, sondern auch mit strukturell ähnlichen Molekülen. Diese Eigenschaften kann für einen Biosensor von Interesse sein, wenn er auf ein Screening für eine Substanzklasse abgestimmt werden soll [15].

#### 2.2.2.7 Molecular Imprinted Polymer (MIP)

Bei dieser Technik werden Monomere mit funktionellen Gruppen und Monomere zur Vernetzung in Gegenwart des Analyten polymerisiert [35]. Der Analyt fungiert als sogenanntes Templat. Die funktionellen Monomere bilden zuerst einen Komplex mit dem Analyten, und durch die nachfolgende Polymerisation werden die funktionellen Gruppen in ihrer Position gehalten. Der Analyt wird entfernt, und es ist eine Bindungsstelle entstanden, die genau auf die Struktur und die Größe des Analyten zugeschnitten ist. MIP's können je nach Art des Analyten mit verschiedenen Signalwandlern kombiniert werden. Es ist zum Beispiel ein MIP zur Detektion von Atrazin beschrieben worden. Atrazin war das Templat. Methacrylsäure war das funktionelle Monomer und Ethylenglycoldimethylacrylat das Vernetzungsmonomer. Die so hergestellten MIP's hatten eine Dissoziationskonstante von  $10^{-6}$  mol/L [36]. Einen guten Überblick über Einsatzmöglichkeiten und bereits entwickelte Systeme unter Verwendung von MIP's liefert [37].

#### 2.2.3 Immobilisierung der biologischen Komponente

Um einen einsatzfähigen Biosensor zu erhalten, muß die biologische Komponente auf den Signalwandler aufgebracht werden.

Es gibt fünf verschiedene Methoden, um die biologische Komponente zu immobilisieren [15]:

1. Adsorption
2. Mikroverkapselung
3. Einbettung in Polymere
4. Quervernetzung
5. Kovalente Bindung

In den nachfolgenden Kapiteln soll kurz auf die verschiedenen Methoden eingegangen werden.

##### 2.2.3.1 Adsorption

Die Adsorption kann grundsätzlich in zwei verschiedene Klassen eingeteilt werden, erstens in die Physisorption und zweitens in die Chemisorption. Diese zwei Klassen unterscheiden sich in der Bindungsenergie  $E_B$ . Bei der Chemisorption ist die Bindungsenergie bei  $E_B \geq 10$  kcal/mol. Es sind hauptsächlich chemische Bindungskräfte für das Haften der Teilchen an der Oberfläche verantwortlich. Diese Bindungskräfte sind oft kovalenter Art. Bei der Physisorption beträgt die

Bindungsenergie  $E_B < 10$  kcal/mol. Hier sind nur van der Waals Kräfte an der Bindung beteiligt. Adsorbiertes Biomaterial ist sehr empfindlich gegenüber Veränderungen im pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke. Die Methode ist aber zufriedenstellend, wenn das adsorbierte Biomaterial nur kurze Zeit benötigt wird.

#### 2.2.3.2 Mikroverkapselung

Bei dieser Methode wird die biologische Komponente durch Umhüllung mit einer semipermeablen Polymermembran auf dem Signalwandler aufgebracht. Es gibt bei dieser Methode entscheidende Vorteile:

- Biologische Komponente und Signalwandler sind nahe beieinander fixiert.
- Die Methode ist sehr flexibel.
- Die Methode ist sehr zuverlässig.
- Das Biomaterial ist geschützt, und die Spezifität bleibt erhalten.
- Das Biomaterial ist weniger anfällig gegenüber Änderungen in Temperatur, pH, Ionenstärke und der Substratkonzentration in der Analytlösung.

Es gibt verschiedene Membrantypen, die eingesetzt werden können, z.B. Zelluloseacetat, Polycarbonat, Kollagen und Polytetrafluorethylen (PTFE).

#### 2.2.3.3 Einbettung in Polymere

Bei dieser Methode wird eine Polymergel-Lösung, in der das Biomaterial enthalten ist, vorbereitet. Die biologische Komponente wird dann während der Polymerisation in die Gelmatrix eingebettet.

Nachteile sind:

- Die Diffusion des Substrates ist verlangsamt, da es durch die Poren der Gelmatrix hindurchdiffundieren muß. Dadurch wird die Reaktion und die Ansprechzeit des Sensors verlangsamt.
- Die Enzymaktivität kann durch die Poren des Gels vermindert werden, da das Substrat das aktive Zentrum des Enzyms unter Umständen nicht mehr erreichen kann.

#### 2.2.3.4 Quervernetzung

Diese Methode benutzt bifunktionelle Moleküle, wie z.B. Glutaraldehyd, um das Biomaterial an den Signalwandler zu binden.

Die Nachteile sind die folgenden:

- Die Reaktion kann die Enzymstruktur verändern und damit einen Verlust der Aktivität hervorrufen.
- Ein Teil des Biomaterial kann innerhalb des Netzwerkes eingeschlossen sein, und damit ist die Diffusion des Substrates behindert.
- Die Quervernetzung liefert keine festen Netzwerke, sondern die Konsistenz ist eher gelatinartig.

Die meist verwendeten Substanzen zur Quervernetzung sind Glutaraldehyd, Hexamethylen-diisocyanat und 1,5-Dinitro-2,4-difluorbenzol.

#### 2.2.3.5 Kovalente Bindung

Enthält die biologische Komponente funktionelle Gruppen, welche nicht während der katalytischen Reaktion benötigt werden, so können sie benutzt werden, um die biologische Komponente kovalent an den Signalwandler zu binden.

Als funktionelle Gruppen kommen  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-OH$ ,  $-C_6H_4OH$ ,  $-SH$  und Imidazol in Frage.

Um eine Denaturierung des Biomoleküls zu verhindern, muß die Reaktion unter milden Bedingungen, wie niedrige Temperatur, niedrige Ionenstärke und unter einem physiologischen pH-Wert ablaufen. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, daß die biologische Komponente während des Einsatzes des Biosensors nicht desorbiert werden kann.

Als Kopplungsreagenzien kommen z.B. Carbodiimide, Cyanurchlorid oder die Diazogruppe in Frage.

#### 2.2.4 Signalwandler

Signalwandler können in folgende Gruppen eingeteilt werden:

1. Elektrochemische Signalwandler.
  - Potentiometrische Detektion.
  - Voltametrische Detektion.
  - Konduktometrische Detektion.
2. Feldeffektransistoren.
3. Optische Signalwandler.
4. Piezoelektrische Signalwandler.
5. Signalwandler, die akustische Oberflächenwellen verwenden.
6. Signalwandler, die thermische Methoden verwenden.

In den folgenden Kapiteln soll kurz auf die einzelnen Gruppen eingegangen werden.

## 2.2.4.1 Elektrochemische Signalwandler

### 2.2.4.1.1 Potentiometrische Detektion

Bei der Potentiometrie wird das Potential zwischen zwei Zellen gemessen, wobei kein Strom fließt. Die Elektroden können Metalldrähte mit einer modifizierten Oberfläche sein, welche sensitiv auf den Analyten reagiert. Oft werden pH-Elektroden oder ionenselektive Elektroden verwendet. Das System besteht aus einer Referenz- und einer Meßelektrode. Beide Elektroden müssen leitfähig miteinander verbunden sein.

Die Größe des Signals hängt von dem Elektrodenmaterial und der Konzentration der Lösung ab.

Das Potential dieser Elektroden hängt von der Aktivität  $a_i$  des Analyten ab. Unter der Voraussetzung, daß Elektrode und Lösung im Gleichgewicht sind und die Referenzelektrode nicht reagiert, kann man die Nernstsche Gleichung zur Bestimmung der Analytkonzentration verwenden.

$$\Delta E = \Delta E^0 + RT/nF \cdot \ln(a_i) \quad (11)$$

$\Delta E^0$  = Standardpotential  
 $F$  = Faradaykonstante  
 $R$  = Gaskonstante  
 $T$  = Temperatur  
 $n$  = Anzahl der übertragenen Elektronen  
 $a_i$  = Aktivität des Analyten

Geht man von verdünnten Lösungen aus, kann man anstelle der Aktivität auch die Konzentration einsetzen.

$$\Delta E = \Delta E^0 + 2.303 \cdot RT/nF \cdot \log c_i \quad (12)$$

Mit Hilfe der Gleichung kann man, wenn  $\Delta E^0$  bekannt ist, über das erhaltene Potential die unbekannt Konzentration berechnen [38,39].

### 2.2.4.1.2 Voltametrie

Voltametrische Sensoren beruhen auf der Messung des Strom-Spannung-Verhältnisses in einer elektrochemischen Zelle. Ein Potential wird angelegt, und der Strom wird gemessen, welcher proportional der Konzentration der elektroaktiven Substanz ist. Die Amperometrie ist ein Spezialfall der Voltametrie. Hier wird ein konstantes Potential als Funktion der Zeit angelegt.

### 2.2.4.1.3 Konduktometrie

In Leitfähigkeitssensoren beruht die Messung auf der Änderung der Leitfähigkeit zwischen zwei Elektroden in Lösung. Die Leitfähigkeit wird gemessen, in dem ein Wechselstrom mit einer kleinen Amplitude angelegt wird, um Polarisation zu vermeiden. Die Anwesenheit einer ionischen Substanz wird durch einen Anstieg der Leitfähigkeit erkennbar.

### 2.2.4.2 Feldeffekttransistoren (FET)

Eine Bauweise des Feldeffekttransistors ist der sogenannte MOS-FET (Metall-Oxide-Semiconductor-Field-Effect-Transistor). Abbildung 2-5 zeigt den schematischen Aufbau eines solchen MOS-FET.

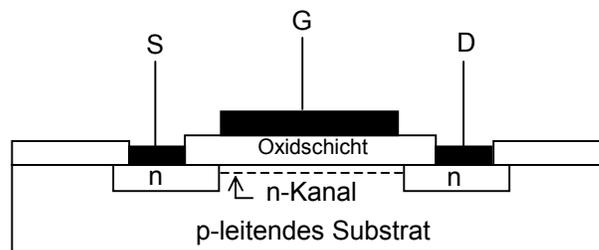


Abb. 2-5 Schematische Zeichnung eines n-Kanal MOS-FET, verändert nach [40].  
S= Source; G= Gate; D= Drain

Bei dieser Bauart ist die Steuerelektrode (Gate G) durch eine isolierende Schicht von dem leitfähigen Kanal getrennt. In das p-leitende Substrat werden zwei Bereiche eingearbeitet, die n-leitend sind. Sie werden als Stromquelle (Source S) und Stromsenke (Drain D) bezeichnet. Liegt an der Steuerelektrode keine oder eine negative Spannung an, so wird der Stromfluß von S nach D gesperrt. Legt man eine positive Spannung an, so sammelt sich negative Ladung an der Grenzfläche zum Oxid im Halbleiter. Es entsteht ein dünner n-leitender Kanal, und der Strom kann von S nach D fließen. Der Stromfluß ist um so besser möglich, je größer die positive Spannung ist. Man könnte den MOS-FET auch als regelbaren Widerstand bezeichnen.

In Biosensoren wird eine abgeänderte Bauart des MOS-FET eingesetzt: der sogenannte Ionenselektive Feldeffekttransistor (ISFET).

Abbildung 2-6 zeigt eine schematische Darstellung eines ISFET. Die Gate-Elektrode ist durch eine ionenselektive Membran ersetzt worden. Der Stromfluß, der im Falle des MOS-FET durch die Spannung an der Gate-Elektrode gesteuert wurde, ist im Falle des ISFET durch die Prozesse bestimmt, die zwischen Elektrolyt und der Oxidschicht ablaufen. Die Membran kann ganz unterschiedliche Eigenschaften haben. Sie kann nur für eine Ionenart durchlässig sein oder es besteht die Möglichkeit, Enzyme in die Membran einzubringen. ISFET's haben den

Vorteil der sehr kompakten Bauart. Ein Problem stellt die Langzeitstabilität dar, da durch Licht, Diffusionsvorgänge und Korrosion die Eigenschaften des ISFET beeinflusst werden können.

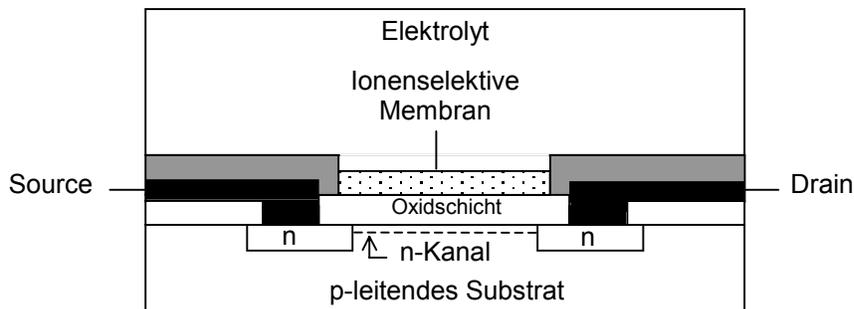


Abb. 2-6 Schematische Darstellung eines ionenselektiven FET.

### 2.2.4.3 Optische Signalwandler.

Die meisten Methoden zur Bestimmung von biologischen Komponenten sind vom photometrischen Typ. Sie sind davon gekennzeichnet, daß während der Reaktion eine Veränderung in einer Komponente des Assays auftritt, die eine starke Veränderung der photometrischen Eigenschaften auslöst. So findet z.B. bei der Bestimmung von Pyruvat mit Lactatdehydrogenase eine Oxidation von Nicotinamidadeninucleotid (NADH) statt. NADH hat ein Absorptionmaximum bei 340nm, welches durch die Oxidation ausgelöscht wird. Die Abnahme der Absorption bei 340nm ist proportional der Pyruvat-Konzentration.

Diese Veränderungen können in konventioneller Weise gemessen werden, indem Analyt und Reagenzien gemischt und die Reaktion in einem Spektrophotometer gemessen werden. Schwieriger ist es, einen Biosensor mit einer optischen Detektion zu realisieren.

Die wichtigste Gesetzmäßigkeit bei optischen Methoden ist das Lambert-Beersche Gesetz:

$$-\log(I/I_0) = A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (13)$$

$I_0$  = Intensität des einfallenden Lichtes  
 $I$  = Intensität des durchgehenden Lichtes  
 $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient  
 $c$  = Konzentration des Analyten  
 $d$  = Weglänge  
 $A$  = Absorption

Die optische Weglänge  $d$  kann in der Konstruktion des Biosensors mit optischem Signalwandler der limitierende Faktor sein. Bei elektrochemischen Signalwandlern ist dies nicht der Fall.

Im deutschen Sprachgebrauch wird für  $-\log(I/I_0)$  Extinktion verwendet. Im englischen Sprachraum wird dafür Absorption verwendet. In der vorliegenden Arbeit soll in Anlehnung an den englischen Ausdruck Absorption für  $-\log(I/I_0)$  benutzt werden.

Die größten Vorteile bei der Verwendung von optischen Methoden sind :

- Eine Referenzelektrode wird nicht benötigt.
- Es gibt keine elektrischen Interferenzen.
- Die immobilisierte Komponente muß nicht in direktem Kontakt mit den optischen Fasern stehen und kann so schnell ausgetauscht werden.
- Es gibt keine Gefahren, die von elektrischen Strömen ausgehen.
- Sie sind sehr stabil in Bezug auf die Kalibrierung, besonders wenn das Verhältnis zwischen zwei Intensitäten gemessen wird.
- Sie können auf mehrere Analyten reagieren, wenn diese verschiedenen Wellenlängen als Signal liefern.

Die Nachteile sind :

- Es können Störungen durch Streulicht auftreten.
- Sie benötigen in der Regel ein großes Volumen an Reagenzien und sind schwierig zu miniaturisieren.
- Es können Stabilitätsprobleme auftreten, wenn die Biosensorkomponenten dem Licht ausgesetzt werden.

#### 2.2.4.4 Piezoelektrische Kristalle

Die elektrischen Eigenschaften dieser Kristalle waren seit Entdeckung der Elektrizität Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die Gebrüder Curie entdeckten 1880, daß anisotrope Kristalle, wie Quarz oder Turmalin, ein elektrisches Signal emittieren, wenn sie mechanisch beansprucht werden. Wird ein elektrisches Potential angelegt, verformen sie sich mechanisch. Oszilliert das angelegte Potential, fangen diese Kristalle an zu schwingen. Jeder Kristall hat eine bestimmte Resonanzfrequenz. Die Frequenzen liegen z.B. im Bereich von 10 MHz. Die Frequenz ist abhängig von der Masse des Kristalls. Eine Änderung der Resonanzfrequenz kann durch die Adsorption eines Analyten hervorgerufen werden. Sie kann mit großer Sensitivität gemessen werden (500-2500Hz/ $\mu\text{g}$ ) [15]. Mit Hilfe der Sauerbrey-Gleichung kann man eine Abschätzung der Änderung der Resonanzfrequenz aufgrund der Massenänderung erhalten.

Für Quarz hat die Sauerbrey-Gleichung folgendes Aussehen:

$$\Delta f = -2.26 \cdot 10^{-6} \cdot (F_0)^2 \cdot \Delta m / A \quad (14)$$

$\Delta f$  = Änderung der Resonanzfrequenz

$F_0$  = Resonanzfrequenz des Kristalls

$\Delta m$  = Massenänderung

$A$  = Oberfläche des Kristalls, auf der das immobilisierte Material aufgebracht ist in  $\text{cm}^2$

Hat man einen Kristall mit der Resonanzfrequenz von 5 MHz kann man Massenänderungen im Nanogramm Bereich detektieren. Detektionslimits im Picogramm Bereich sind nicht selten [18].

Außer den erwähnten Kristallen besitzen auch keramische Materialien einen piezoelektrischen Effekt, wie z.B. Bariumtitanat. Einige organische Polymere wie z.B. Polyvinylidenfluorid bilden Kristalle mit piezoelektrischen Eigenschaften.

#### 2.2.4.5 Methoden mit akustischen Wellen

Diese Techniken benutzen einen piezoelektrischen Kristall, aber die Wellen werden nicht innerhalb der Lösung, sondern auf der Oberfläche des Kristalls generiert. Ein Transmitter und ein Receiver werden an entgegengesetzten Enden des Kristalls aufgebracht. Transmitter und Receiver bestehen aus interdigitalen Elektrodenpaaren. Wird nun ein Radiofrequenzsignal (Transmitter) angelegt, gerät der Kristall unter mechanischen Streß und produziert eine Rayleigh-Oberflächenwelle, welche von einem zweiten Set an Elektroden (Receiver) empfangen und in ein Potential umgewandelt wird. Die Oberflächenwelle wandert durch den Kristall bis zu einer Tiefe von circa einer Wellenlänge. Aufgrund dessen, wird eine Komponente, die auf der Oberfläche immobilisiert ist, die Übertragung der Welle beeinflussen [15].

#### 2.2.4.6 Thermische Methoden

Biochemische Reaktionen mit Enzymen generieren Wärme. Diese Wärme kann gemessen werden. In Kombination mit der Selektivität der Enzyme kann man einen thermischen Biosensor entwickeln. Diese Technik benötigt ein elektrisches Widerstandsthermometer, welches Temperaturunterschiede bis zu  $0.001^\circ\text{C}$  messen kann. Die Enthalpieänderungen bei der Enzymreaktion liegen im Bereich von 25-100 kJ/mol.

Diese Art der Detektion bildet den kleinsten Anteil an allen bisher entwickelten Biosensoren [41].

### 3. Antikörper

Um eine wirksame Abwehr vor den Angriffen anderer Organismen zu haben, haben Lebewesen eine effektive Strategie entwickelt, das Immunsystem. Gelingt es Krankheitserregern, die Barriere der Haut und der Schleimhäute zu durchbrechen, werden sie vom Immunsystem als fremd erkannt und beseitigt. Bei den Wirbeltieren ist für die Immunität eine bestimmte Art der weißen Blutkörperchen verantwortlich, die Lymphozyten. Sie werden im Knochenmark gebildet und haben die Eigenschaft, daß sie das Blutssystem verlassen und so auch in den Räumen zwischen den Zellen nach Fremdkörpern suchen können. Über die Lymphgefäße gelangen sie wieder in das Blutssystem. Generell kann man zwei verschiedene Arten der Immunität unterscheiden [42,43]:

1. Die zelluläre Immunität richtet sich gegen virusinfizierte Zellen, Pilze, Parasiten und fremdes Gewebe. Sie wird durch die T-Lymphozyten hervorgerufen, welche in der Thymus-Drüse entstehen.
2. Die humorale Immunität richtet sich primär gegen Bakterieninfektionen. Sie wird von vielen Proteinen getragen, welche man als Antikörper oder Immunoglobuline bezeichnet. Immunoglobuline werden von B-Zellen produziert, welche im Knochenmark gebildet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper zur Entwicklung eines Immunoassays verwendet, deswegen soll in den nachfolgenden Kapiteln etwas näher auf die Struktur und Wirkungsweise von Antikörpern eingegangen werden.

#### 3.1 Immunoglobuline

Immunoglobuline (Ig) können in 5 verschiedenen Klassen eingeteilt werden, IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Sie besitzen alle dieselbe Grundstruktur. Abbildung 1 zeigt die Struktur eines IgG Moleküls. Es besteht aus jeweils zwei leichten Ketten (L-Ketten) und zwei schweren Ketten (H-Ketten). Die Masse beträgt 23kD bzw. 50-75kD. V ( $V_L/V_H$ ) bezeichnet die variablen Bereiche in der leichten und schweren Kette, C ( $C_L/C_{H1}/C_{H2}/C_{H3}$ ) die konstanten Bereiche. Die konstanten Bereich in der schweren Kette gliedern sich in drei Regionen auf, die zu den konstanten Bereichen der leichten Kette homolog sind. Die Variabilität in den  $V_L$  und  $V_H$  Regionen sind nicht überall gleich. In den variablen Bereichen können noch drei hypervariable Bereiche unterschieden werden. In diesen Bereichen gibt es mehr Aminosäureaustausche als in den übrigen Bereichen der  $V_L$ - und  $V_H$ -Region. Diese hypervariablen Bereiche bilden die

Antigenbindungsstelle. Die einzelnen Untereinheiten werden durch Disulfid-Brücken und nichtkovalenten Bindungen zusammengehalten. Bei strukturaufklärenden Analysen wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen eine Y-förmige Struktur des IgG-Antikörpers gefunden. Immunoglobuline sind Glycoproteine, bei denen an jeder schweren Kette ein Oligosaccharid verankert ist. Durch Proteolyse mit Papain läßt sich das IgG Molekül in drei Teile von je ca. 50kD Gewicht spalten. Zwei davon werden als  $F_{ab}$  Fragmente bezeichnet und eines als  $F_c$  Fragment.  $F_{ab}$  bedeutet „antigen binding“, da sie die Antigenbindungsstelle beinhalten.

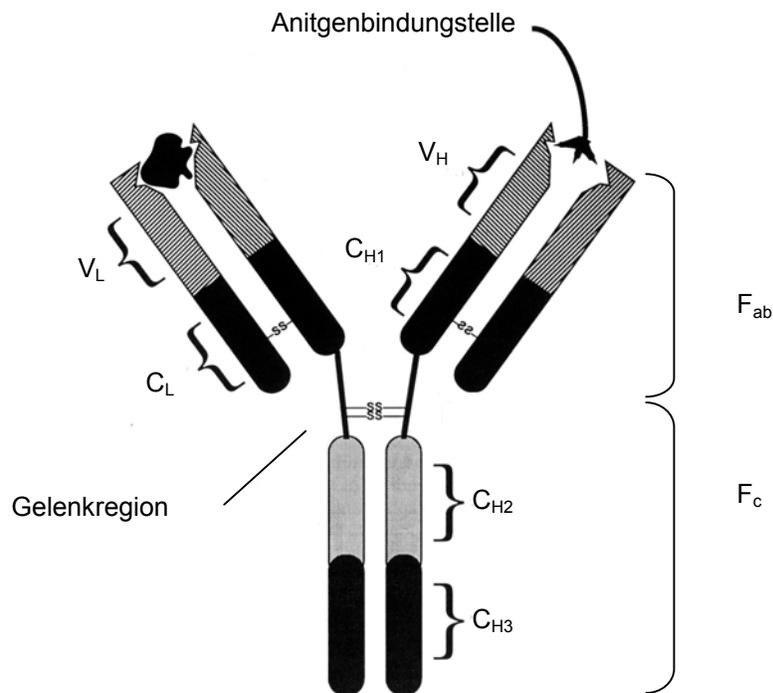


Abb. 3-1 Schematische Darstellung eines IgG Moleküls, verändert nach [44].

In Tabelle 3-1 sind die Eigenschaften der einzelnen Immunoglobulin-Klassen dargestellt. Antikörper werden von den B-Zellen produziert. Diese B-Zellen tragen in der Plasmamembran verankerte Immunoglobuline. Binden diese an das Antigen, schließt die B-Zelle das Antigen ein und verdaut es teilweise. Fragmente dieses Antigens werden dann auf der Zelloberfläche präsentiert. Bestimmte T-Lymphozyten erkennen diese Fragmente und regen die B-Zelle zur Teilung an. Die meisten Nachkommen dieser B-Zelle sind Plasmazellen, welche den für das Antigen spezifischen Antikörper freisetzen.

	IgM	IgD	IgG	IgE	IgA
Symbol der schweren Kette	$\mu$	$\delta$	$\gamma$	$\epsilon$	$\alpha$
Mittlere Serumkonzentration im Blut [mg/mL]	1	0.03	12	0.0003	2
Halbwertszeit in Tagen	5	3	25	2	6
Anzahl der aus vier Ketten bestehenden Monomere im Antikörper	5	1	1	1	1,2, oder mehr
Besondere Eigenschaften	Findet sich hauptsächlich im Blut. Erscheint früh bei der Immunantwort	Hauptsächlich auf der Oberfläche von B-Zellen.	Einziges Antikörper, der die Plazenta durchqueren kann.	Schützt gegen Parasiten und ist bei allergischen Reaktionen beteiligt	Kommt primär im Verdauungstrakt und in Körperflüssigkeiten vor z.B. Muttermilch

Tab. 3-1 Eigenschaften der unterschiedlichen Immunglobulin-Klassen.

Um eine Immunantwort zu induzieren, muß das Antigen die Größe von 5000D überschreiten. Kleine Moleküle, die sogenannten Haptene, können durch eine Kopplung an ein größeres Trägermolekül antigen wirksam werden. Einige der produzierten Antikörper binden dann auch das Hapten ohne Trägermolekül. Die Antigenbindungsstelle wird auch Paratop genannt. Die Bindungsstelle am Antigen heißt Epitop. Proteine haben meist mehrere Epitope, Haptene besitzen aufgrund ihrer geringen Größe nur ein Epitop.

Die Bindung des Antigens (Ag) durch den Antikörper (Ak) ist eine reversible bimolekulare Reaktion, wenn man nur ein Paratop des Antikörpers und ein Epitop des Antigens betrachtet. Antigen und Antikörper reagieren zu dem Antikörper-Antigen-Komplex (Ak-Ag).



Die Affinitätskonstante K ist durch folgenden Quotienten definiert:

$$K = \frac{[\text{Ak-Ag}]}{[\text{Ak}][\text{Ag}]} \quad (16)$$

K liegt für die meisten Antikörper im Bereich von  $10^5$ - $10^{11}$  L/mol. Diese Gleichung gilt nur für die einfache bimolekulare Reaktion eines Epitops des Antigens mit einem Paratop eines homogenen Antikörpers. In Wirklichkeit können die Verhältnisse wesentlich komplexer sein, so daß kompliziertere Gleichungen zur Bestimmung der Kinetik des Antikörper-Antigen-Komplexes angewendet werden müssen. Liegen in einem Serum mehrere Antikörper vor, die spezifisch mit verschiedenen Epitopen des Antigens reagieren, für die wiederum verschiedene Affinitäten

gelten, komplizieren sich die Verhältnisse noch einmal. Es wurde der Begriff der Avidität eingeführt, um die scheinbare Affinität eines solchen Antikörpergemisches zu beschreiben.

Bei der Bindung des Antigens durch den Antikörper sind van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Ion-Ion-Wechselwirkungen beteiligt.

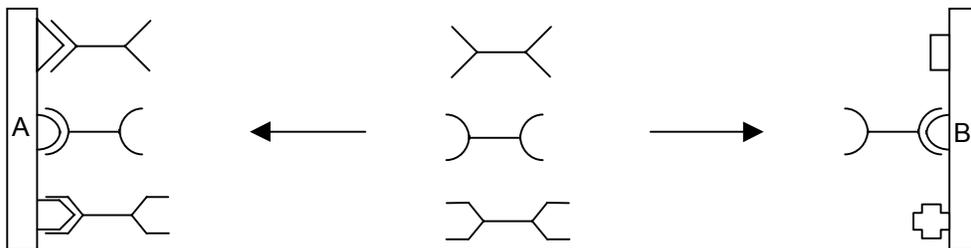
Das Hapten füllt die Antigenbindungstelle nur teilweise aus, dadurch ist die Stärke der Bindung bei Haptene nicht so groß. Die Spezifität, die mit einem Protein als Antigen erreicht werden kann, ist um ein Vielfaches höher.

### 3.2 Kreuzreaktivität

Antikörper erkennen nicht nur das Antigen, das ihre Bildung induziert hat, sondern auch strukturähnliche Verbindungen, in manchen Fällen auch völlig andere Verbindungen. Die Ursache dafür liegt in der Tatsache, daß Antikörper eher bestimmte dreidimensionale Formationen erfassen, als spezielle chemische Strukturen. Dieses Phänomen nennt man Kreuzreaktivität. Antikörper, die die Fähigkeit besitzen, strukturell ähnliche Epitope zu binden, nennt man polyfunktionelle Antikörper.

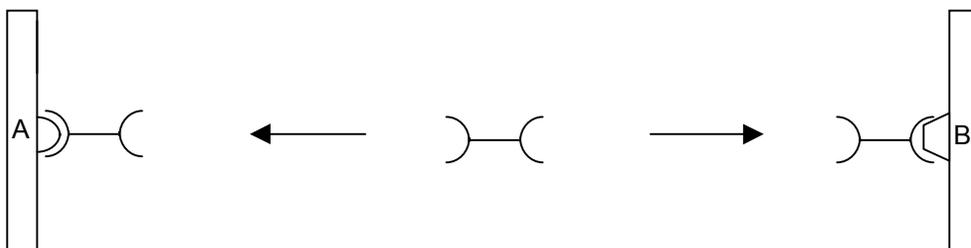
Man kann zwei verschiedene Arten von Kreuzreaktivitäten unterscheiden[45]:

#### 1. Shared Reactivity



Das Antigen A und B haben ein oder mehrere gemeinsame Epitope. Dadurch werden die Antikörper eines polyklonalen Serums mit A und B reagieren.

#### 2. Kreuzreaktivität



Hier reagiert der Antikörper mit homologen, wie auch mit strukturell verschiedenen Epitopen. Die strukturell unterschiedlichen Epitope werden normalerweise aufgrund einer geringeren

Affinität weniger fest gebunden. Bei der shared reactivity liegt kein Unterschied in der Affinität vor.

### 3.3. Produktion monoklonaler Antikörper

Ein polyklonales Serum kann hochspezifisch sein, obwohl es in Bezug auf alle Unterklassen an Antikörpern uneinheitlich ist. Das Spektrum der Affinitäten der unterschiedlichen Antikörper kann stark variieren, und jeder dieser Antikörper kann verschieden stark ausgeprägte Kreuzreaktivitäten in Bezug auf die einzelnen Antigene haben. Bei monoklonalen Seren kann man durch geschickte Auswahl der Klone eine hohe Spezifität der produzierten Antikörper erreichen.

Antikörper sind wertvolle Werkzeuge in der medizinischen Forschung geworden. Aber nicht nur in der Medizin, sondern auch in der analytischen Chemie spielen sie zunehmend eine große Rolle. Sogenannte immunochemische Analysenmethoden ziehen ihren Nutzen aus der spezifischen Antikörper-Antigen-Reaktion. Durch die Immunisierung von Tieren können aus deren Blutserum Antikörper gewonnen werden. Diese Antikörper sind zunächst polyklonale Antikörper, d.h. sie bestehen aus einer Population von unterschiedlichen Antikörpern, welche auf verschiedene Epitope des Antigens spezifisch sind. Ein großes Problem bei der Verwendung von polyklonalen Antikörpern ist die endliche Lebensdauer der immunisierten Tiere. Mitte der siebziger Jahre wurde dann eine Methode entwickelt, die die Selektion und Vermehrung eines einzelnen Antikörpers ermöglichte, die Hybridomtechnologie. Abbildung 3-2 zeigt den schematischen Ablauf dieser Technik. Zuerst wird einer Maus ein Protein X injiziert, und das Immunsystem reagiert mit der Bildung von Antikörpern gegen das Protein. Milzzellen werden der immunisierten Maus entnommen, und einige davon produzieren den Antikörper gegen das Protein. Werden diese Zellen mit Myelomzellen fusioniert, entstehen unsterbliche Zellklone, die kultiviert werden können. Myelomzellen sind entartete Lymphozyten die unbegrenzt in Kulturmedien gehalten werden können. Im Lauf der Jahre sind verschiedene Myelomzelllinien entwickelt worden, welche einen bestimmten Syntheseweg für Purine nicht mehr beschreiten können. Diese Zellen können in einem sogenannten HAT-Medium nicht mehr wachsen. Das HAT Medium enthält Hypoxanthin, Aminopterin, und Thymidin. Die entnommenen Milzzellen können den Purinsyntheseweg beschreiten, und die Zellklone aus Milzzelle und Hybridomzelle können im HAT-Medium wachsen. Aber Milzzellen sind nicht unbegrenzt in Kultur haltbar, deswegen sterben alle anderen nichtfusionierten Zellen ab. Die einzelnen Hybridomzellen werden in Kulturmedien vermehrt, und es können einzelnen Klone ausgewählt werden, welche einen bestimmten Antikörper gegen das Protein produzieren.

So gewonnene Antikörper nennt man monoklonale Antikörper, da diese nur aus einer homogenen Population von Antikörpern bestehen [46].

Tabelle 3-2 stellt die unterschiedlichen Eigenschaften von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegenüber.

Eigenschaft	Polyklonaler Antikörper	Monoklonaler Antikörper
Verfügbarkeit	Begrenzte Menge	Unbegrenzte Menge
Physikalische Homogenität	Oft große individuelle Unterschiede zwischen Seren verschiedener Blutentnahmen.	Einheitliche Eigenschaften
Affinität	Mischung von unterschiedlichen Affinitäten	Einheitliche Affinität
Kreuzreaktivität	In der Regel vorhanden durch ein Gemisch von unterschiedlichen Spezifitäten	In Abhängigkeit vom Antikörper unterschiedlich hoch
Immunglobulin Klassen	Ganzes Spektrum	Nur eine Klasse
Anforderung an das Immunogen	Hohe Reinheitsanforderungen für spezifische Seren	Geringer, da die Auswahl der Spezifität im Klonstadium durchgeführt wird

Tabelle 3-2 Unterschiedliche Eigenschaften von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern.

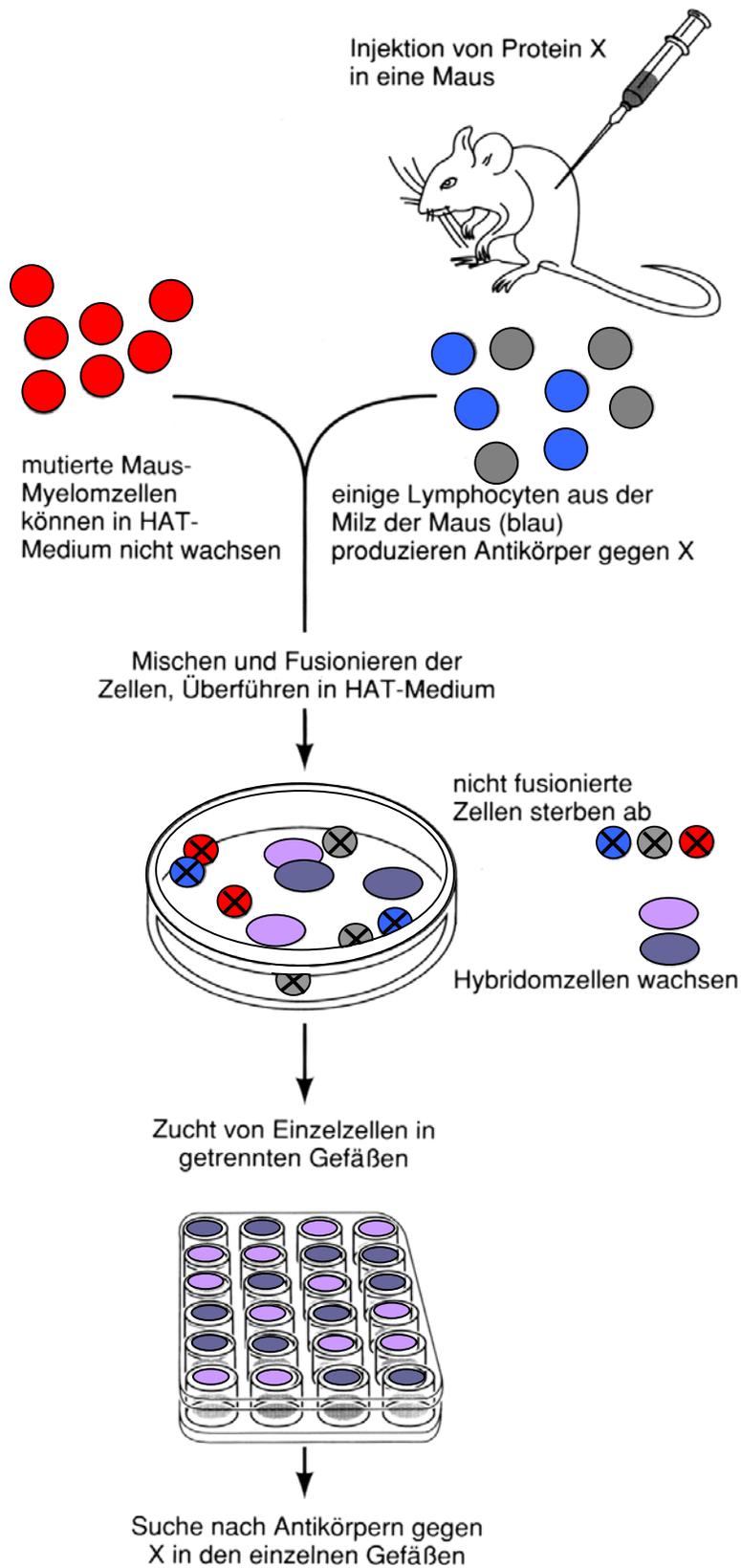


Abb. 3-2 Schematischer Ablauf der Produktion monoklonaler Antikörper, verändert nach [42].

### 3.4 Der monoklonale Antikörper K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>

In der vorliegenden Arbeit wurde ein gegen Atrazin gerichteter monoklonaler Antikörper verwendet [47]. Der Antikörper wurde durch Hybridomtechnologie erzeugt [47-49]. 2-(6-Amino-hexansäure)-4chlor-6-ethylamino-1,3,5-triazin (Amino-capronsäuresimazin) wurde mit Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) als Protein gekoppelt. Keyhole Limpet Hemocyanin ist ein Protein aus der Atmungskette einer Nacktschneckenart.

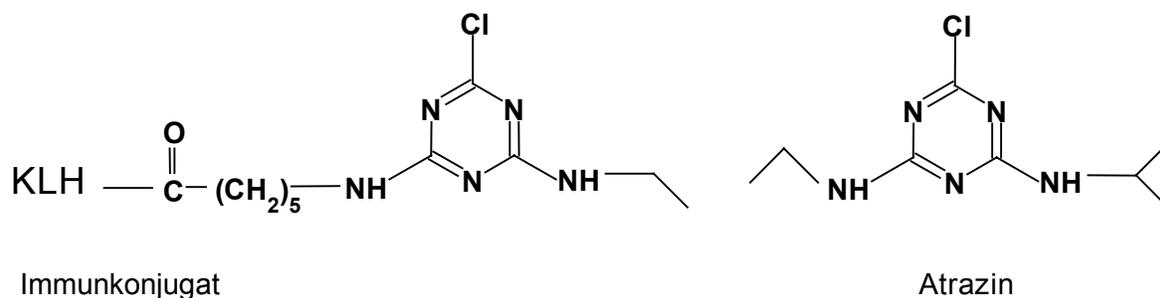


Abb. 3-3 Struktur des Immunkonjugates und des Atrazins.

Mäuse wurden über mehrere Wochen mit dem Immunkonjugat immunisiert. Die Antikörper produzierenden Milzzellen wurden mittels Polyethylenglycol mit Myelomzellen in der exponentiellen Wachstumsphase fusioniert. Die Selektion der Antikörper produzierenden Hybridomzellen erfolgte durch Kultivierung in HAT Medium. Nach zwei Wochen wurden die Zellkulturüberstände auf die Anwesenheit von atrazinspezifischen Antikörpern untersucht. Positiv getestete Hybridomkolonien wurden erneut kloniert, getestet und subkloniert. Die Aufreinigung der spezifischen monoklonalen Antikörper erfolgte durch Affinitätschromatographie.

In Tabelle 3-3 sind die Kreuzreaktivitäten des Antikörpers K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> mit verschiedenen Triazin-Derivaten aufgezählt.

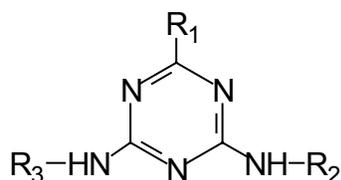


Abb. 3-4 Allgemeine Struktur der Triazine.

Derivat	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Kreuzreaktivität
Atrazin	-Cl	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	100%
Dichloratrazin	-Cl	-Cl	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5%
Desethylatrazin	-Cl	-H	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	18%
Deisopropylatrazin	-Cl	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	8%
Cyanazine	-Cl	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-C <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	28%
Hydroxyatrazin	-OH	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.1%
Simazin	-Cl	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	4%
Dichlorsimazin	-Cl	-Cl	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	2%
Propazin	-Cl	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	136%
Terbutylazin	-Cl	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	26%

Tab. 3-3 Kreuzreaktivitäten für den Antikörper K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> gemäß Abb. 3-4

### 3.5. Immunoassay

#### 3.5.1 Unterscheidung der Immunoassays

Der Immunoassay ist eine analytische Methode, die zur Detektion, Separation und Quantifizierung von organischen und anorganischen Analyten eingesetzt werden kann. Immunoassays nutzen die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion aus, um Antigene (Ag) oder Antikörper (Ak) nachzuweisen.

Der Nachweis dieser Reaktion erfolgt in der Regel durch einen vorher zugegebenen Tracer. Dies sind markierte Antikörper oder Antigene. Die Markierung kann durch alle Systeme vorgenommen werden, die ein analytisch verwertbares Signal liefern. Am häufigsten werden Enzyme und Radioisotope zur Markierung verwendet. Bei Radioisotopen kann man in der Regel von höheren Sensitivitäten ausgehen, aber man hat den Nachteil der radioaktiven Abfälle und deren Entsorgung.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Enzym zur Markierung verwendet, und deswegen beziehen sich die folgenden Abschnitte auf Enzym-Immunoassays.

Bei der Einteilung von Immunoassays [45] kann man generell zwischen zwei Gruppen unterscheiden: erstens dem homogenen Testformat und zweitens dem heterogenen Testformat. Der Hauptunterschied zwischen diesen beiden Formaten besteht darin, daß bei dem homogenen Format keine Immobilisierung von Antigenen oder Antikörpern an eine feste

Phase erfolgt und damit alle Komponenten in der Lösung vorliegen. Innerhalb dieser Gruppen kann man noch zwischen kompetitiven und nicht-kompetitiven Formaten unterscheiden. In den folgenden Kapiteln soll kurz auf die verschiedenen Testformate eingegangen werden.

#### 3.5.1.1 Homogene Immunoassays

Bei kompetitiven homogenen Immunoassays wird die Aktivität des an das Hapten gekoppelten Enzyms durch die Bindung an den Antikörper moduliert. Diese Art des Immunoassays ist effizient und präzise, da die Anzahl an Arbeitsschritten minimiert wird. Da jedoch alle Komponenten in der Lösung vorliegen, ist die Gefahr von Matrixeinflüssen groß. Diese Art des Immunoassays wird vor allem bei kleinen Haptenen eingesetzt, da die Modulation des Enzyms hauptsächlich über sterische Effekte erreicht wird und nur dann erfolgversprechend ist, wenn sich die Antikörperbindungstelle nahe bei dem Enzym befindet. Ist freier Analyt in der Lösung vorhanden, wird die Ausbildung des Antigen-Antikörper-Komplexes je nach Konzentration des Analyten unterbunden.

Der nichtkompetitive homogene Immunoassay wird nicht oft eingesetzt, da er die Verwendung von zwei enzymmarkierten monoklonalen Antikörpern erfordert, die gegen zwei unterschiedliche Epitope des Antigens gerichtet sind. Die zwei Antikörper sind mit zwei verschiedenen Enzymen markiert, wobei das eine das Substrat für das andere Enzym produziert. Die Substratreaktion wird nur dann katalysiert, wenn die beiden Antikörper in räumlicher Nähe zueinander stehen.

#### 3.5.1.2 Heterogene Immunoassays

Heterogene Immunoassays erfordern die Immobilisierung von Antikörper oder Antigen.

In der Klasse der heterogenen Immunoassays mit Antikörper- oder Antigenimmobilisierung kann noch zwischen kompetitiven und nicht-kompetitiven Formaten unterschieden werden.

Der nicht-kompetitive Immunoassay mit Antikörperimmobilisierung wird hauptsächlich zur Quantifizierung von Antigenen verwendet. Eine Voraussetzung für diese Methode ist, daß das eingesetzte Hapten zwei Epitope besitzt, da die Detektion des gebundenen Antigens mit einem markierten Antikörper erfolgt.

Der kompetitive Immunoassay mit Antikörperimmobilisierung ist das Format, welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Bei diesem Format wird der Antikörper an der Oberfläche immobilisiert. In einem Kompetitionschritt konkurrieren Tracer und Analyt um die

---

Antikörperbindungsstellen. Der gebundene Tracer katalysiert die entsprechenden Substratreaktion, und das erhaltene Meßsignal ist der gebundenen Tracermenge proportional, und damit ein Maß für den Analyten.

Bei dem kompetitiven Immunoassay mit Antigenimmobilisierung wird ein dem Analyt ähnliches Molekül, das Hapten, auf der Oberfläche immobilisiert. In einem Kompetitionschritt konkurrieren Antikörper, Analyt und Hapten um die Bindungsstellen. Die Menge an gebundenem Antikörper wird durch einen enzymmarkierten sekundären Antikörper nachgewiesen. Der sekundäre Antikörper reagiert spezifisch auf den primären Antikörper. Ist kein Analyt in der Lösung vorhanden, ist die Tracerbindung maximal, und es resultiert ein großes Signal (Nullprobe). Ist viel Analyt in der Lösung vorhanden, wird die Bindung des Tracer vermindert, und es wird weniger Enzym auf der Oberfläche vorhanden sein. Es resultiert ein geringeres Signal (Überschußprobe). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Enzym verwendet, welches eine pH-Änderung induziert. Der Nachweis erfolgte über einen pH-abhängigen Farbstoff oder eine pH-Elektrode. Der Farbstoff wird bei großer  $H^+$ -Konzentration entfärbt, d.h. die Nullprobe hat eine geringe Absorption und die Überschußprobe eine hohe Absorption.

Abbildung 3-5 zeigt den schematischen Ablauf des kompetitiven Immunoassay mit Antikörper- und mit Haptenimmobilisierung.

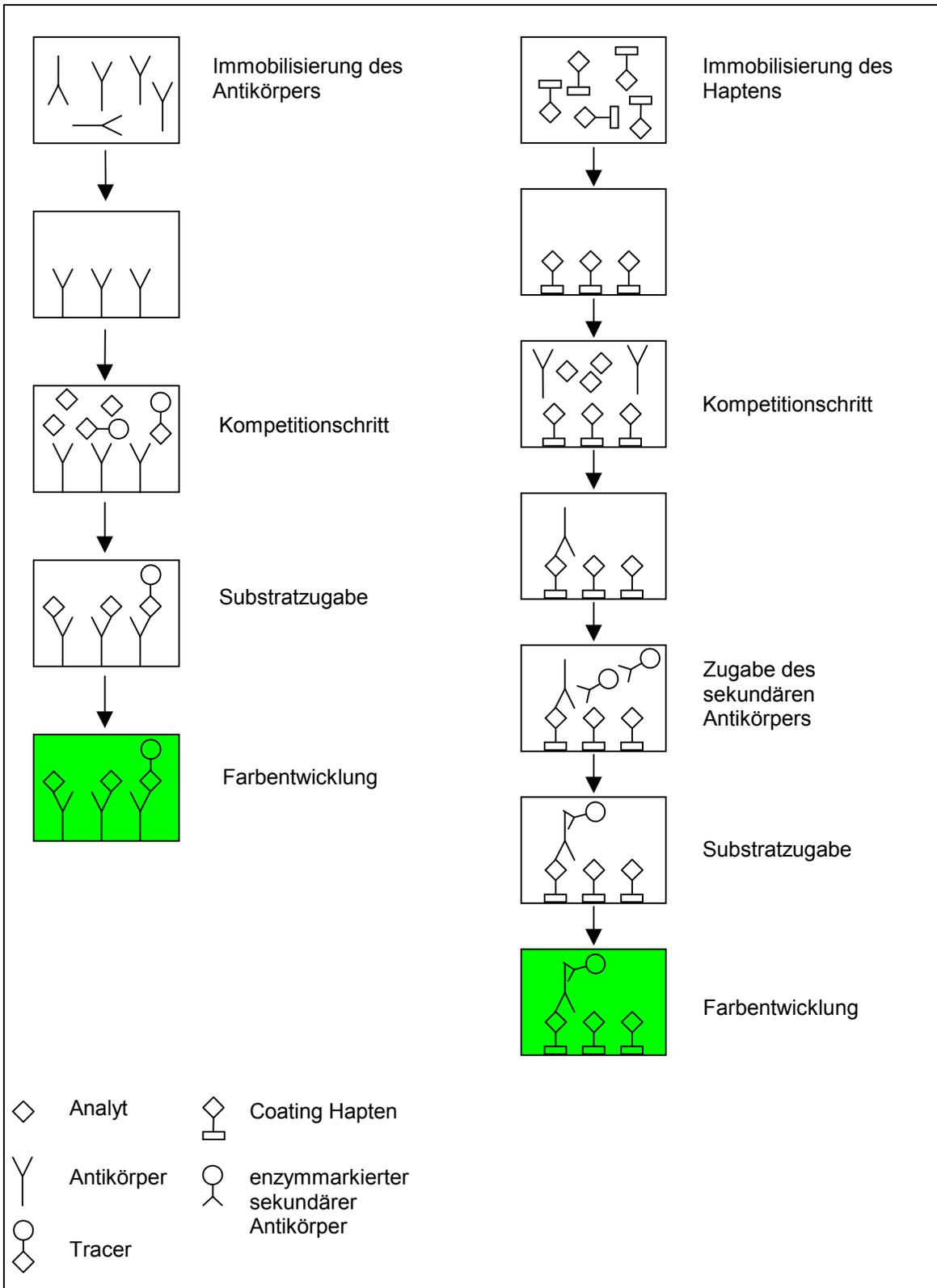


Abb. 3-5 Schematischer Ablauf des kompetitiven Immunoassay mit Antikörper- bzw. mit Haptene immobilisierung.

### 3.5.2 Auswertung von Immunoassay-Daten

Bei der Auswertung von Immunoassay-Daten erhält man eine Kalibrierkurve, aus der man dann eine unbekannte Analytkonzentration einer Probe ablesen kann. Kalibrierkurve und Probe sollten bei der Ausführung des Assays auf einer einzigen Mikrotiterplatte aufgenommen werden [47].

Aufgrund der durch die Antigen-Antikörper-Komplexbildung auftretenden Kinetik besteht ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen erhaltenem Messwert und Analytkonzentration. Die Kalibrierkurve wird folgendermaßen aufgenommen: Im Assay werden eine Nullprobe (Standard ohne Analyt) und eine Überschußprobe (Standard mit Analyt, in einer Konzentration, die zu einer maximalen Sättigung des Antikörpers mit Analyt führt) und eine bestimmte Anzahl an Standards, deren Analytkonzentrationen zwischen diesen beiden Extremen liegen, eingesetzt. Die erhaltenen Messwerte liefern aufgrund der Kinetik der Antigen-Antikörper-Reaktion eine Kurve mit einer sigmoidalen Form. Die Auswertung kann einmal aufgrund der erhaltenen Rohdaten erfolgen oder es sind in der Literatur viele verschiedene Methoden eingeführt worden, eine Kurvenanpassung durchzuführen [44,50-57].

#### 3.5.2.1. 4-Parameter-Gleichung nach Rodbard

Am häufigsten wird heutzutage die 4-Parameter-Gleichung von Rodbard [54] verwendet:

$$Y = (a-d) / (1+(x/c)^b) + d \quad (17)$$

a = Maximum der Absorption

b = Steigung der sigmoiden Kurve

c = Konzentration am Wendepunkt der Kurve (= Testmittelpunkt  $I_{50}$ )

d = Minimum der Absorption

Die Werte von a und d werden durch Iteration oder Regression mittels eines geeigneten Computerprogrammes erhalten.

Abbildung 3-6 zeigt eine typische Kalibrierkurve nach der 4-Parameter Gleichung aufgrund der durch Messung erhaltenen Rohdaten.

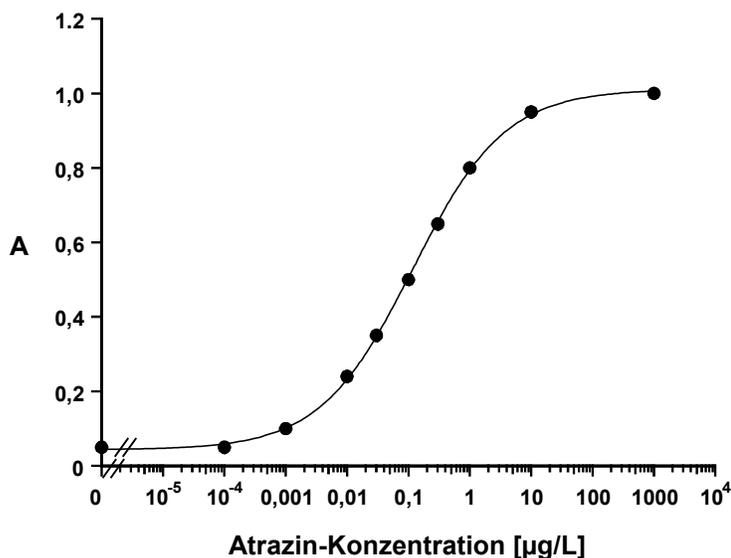


Abb. 3-6 Auswertung der erhaltenen Absorptionswerte A mit der 4-Parameter-Gleichung.

Normalerweise werden nicht die direkt aus der Messung erhaltenen Absorptionswerte für die Kalibrierkurve verwendet, da unterschiedliche Immunoassays nur verglichen werden können, wenn die Daten vorher normalisiert worden sind.

### 3.5.2.2 Auswertung nach Normalisierung der Absorptionswerte auf % B/B<sub>0</sub> -Werte

Der B-Wert repräsentiert die Menge an gebundenem Tracer bei Antigenzugabe, der B<sub>0</sub>-Wert dagegen die Menge an gebundenem Tracer ohne Antigenzugabe. Durch die Auftragung von B/B<sub>0</sub> -Werten gegen die Antigenkonzentration ergibt sich eine normalisierte Kurve. Die Werte liegen in dem Bereich zwischen 0 und 1. Sie repräsentieren das Verhältnis zwischen Tracerbindung und Analytbindung. Normalerweise werden sie in Prozent angegeben. Die Skala reicht von 0% bis 100%. 0% repräsentiert die minimale Tracerbindung und maximale Analytbindung. 100% repräsentiert die maximale Tracerbindung und minimale Analytbindung. Nachdem die Extinktionswerte auf %B/B<sub>0</sub>-Werte umgerechnet worden sind, kann wiederum die Hill-Kinetik zur Berechnung einer Kalibrierkurve benutzt werden. Es können nur Kurven miteinander verglichen werden, die auf diese Weise normalisiert worden sind.

$$\% B/B_0 = (A_{\bar{U}} - A_P) / (A_{\bar{U}} - A_0) * 100 \quad (18)$$

A<sub>p</sub> = Absorptionswert der Probe

A<sub>0</sub> = Absorptionswert des Nullwertes

A<sub>ü</sub> = Absorptionswert des Überschuwertes

Abbildung 3-7 zeigt eine nach der 4-Parameter Gleichung berechnete normalisierte Kurve, unter Verwendung der erhaltenen %B/B<sub>0</sub>-Werten.

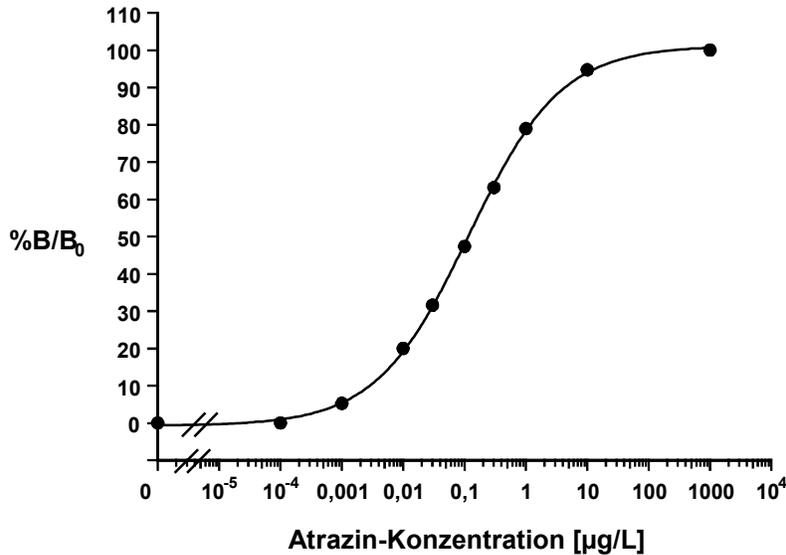


Abb.3-7 Auswertung der erhaltenen Absorptionwerte nach Umformung auf % B/B<sub>0</sub> –Werte.

### 3.5.2.3 Linearisierung mittels logit-log-Transformation

Werden die % B/B<sub>0</sub> -Werte mit der logit-log-Transformation ausgewertet, erhält man eine Gerade, die auch zur Bestimmung der gesuchten Konzentration verwendet werden kann. Für diese Auftragung müssen die Plateaus der sigmoiden Kalibrierkurve genau bestimmt werden. Sind die Werte für die Plateaus festgelegt, entspricht die Steigung der nach der logit-log-Transformation erhaltenen Geraden der Steigung der Geraden in der sigmoiden Kalibrierkurve.

$$\text{logit } \% B/B_0 = \ln \left( \frac{\% B/B_0}{100 - \% B/B_0} \right) \quad (19)$$

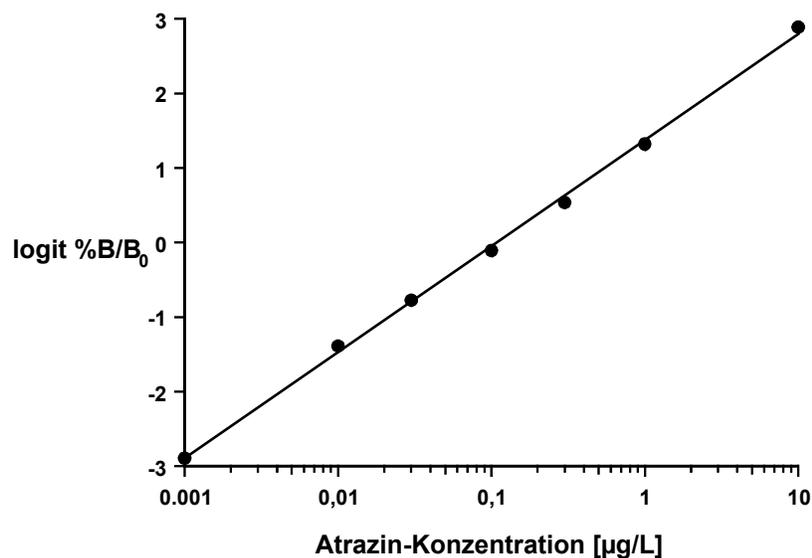


Abb. 3-8 Auswertung nach vorheriger Linearisierung der % B/B<sub>0</sub>-Werte.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Auswertung der Immunoassay Daten zwei verschiedene Programme verwendet. Zuerst wurden Kalibrierkurven mit der 4-Parameter-Gleichung aus den erhaltenen Rohdaten mit dem Programm Biolinx 2.21 erstellt. Dieses Programm war auch Bestandteil der Steuerungssoftware des EIA-Readers.

Die erhaltenen Absorptionswerte wurden dann mit dem Programm Fig.P für Windows von Biosoft nachbearbeitet, da nur so die Auftragung von %B/B<sub>0</sub> möglich war. Die Auswertung der erhaltenen Kurven erfolgte mittels der Auftragung %B/B<sub>0</sub> und der 4-Parameter-Gleichung. Eine Linearisierung mittels logit-log-Transformation wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet.

### 3.5.3 Reproduzierbarkeit, Nachweisgrenze und Sensitivität

Um eine Abschätzung über die Güte eines entwickelten Immunoassays zu treffen, wurden von der Union of Pure and Applied Chemistry folgende Richtlinien herausgegeben [58]:

1. Der Variationskoeffizient am Testmittelpunkt sollte nicht über 15% liegen. Am Detektionslimit sollte der Variationskoeffizient nicht über 25% steigen.
2. Bei der Wiederholung eines Assays am gleichen Tag sollte der Variationskoeffizient unter 12.5% liegen. Bei Wiederholungen an verschiedenen Tagen unterhalb von 25%.

Der Begriff der Nachweisgrenze wird in der Literatur sehr unterschiedlich benutzt. So existieren viele Untersuchungen, die das Detektionslimit sehr unterschiedlich definieren. Es sind Werte von 5, 10, 15, 20 %B/B<sub>0</sub> benutzt worden. Andere Autoren machen eine visuelle Inspektion der Kurve. Es sind auch Artikel erschienen, die die Nachweisgrenze aus der Standardabweichung  $s$  der Absorption der Nullprobe entnehmen, indem sie 3s oder 2s als Nachweisgrenze angeben [57].

Unter Sensitivität wird in dieser Arbeit der Testmittelpunkt  $I_{50}$  verstanden. Der Testmittelpunkt entspricht dem Parameter  $c$  in der 4-Parameter Gleichung von Rodbard oder dem 50 %B/B<sub>0</sub>-Wert in der normalisierten Kurve.

Die Auswahl des Haptens zur Darstellung des Tracers hat einen entscheidenden Einfluß auf die Lage des  $I_{50}$ -Wertes [59-66]. So wird der niedrigste  $I_{50}$ -Wert mit einem Hapten erreicht, welches die geringste Affinität zum Antikörper aufweist [60,63,66]. Die Kohlenstoffkette, welche die funktionelle Gruppe zur Kopplung des Haptens an das Enzym trägt, sitzt am C2-Atom des Triazin-Ringes. Die Länge der Kohlenstoffkette, die zur Fixierung des Haptens an dem Enzym benutzt wurde, spielt eine Rolle bei der Lage des  $I_{50}$ -Wertes [61]. So werden in [61] die sensitivsten Immunoassays bei geringerer Spacerlänge gefunden. Die Meinungen gehen auseinander, ob eine direkte Anbindung an das Enzym in sensitiveren Assays resultiert, oder ob eine kleine Kohlenstoffkette nötig ist, um den Tracer dem Antikörper zu präsentieren. In [63] wird von einem sensitiven Immunoassay berichtet, der keinen Spacer mehr beinhaltet, währenddessen in [61] bei völligem Verzicht auf einen Spacerarm keine Erkennung des Tracer durch einen TNT-spezifischen Antikörper mehr erfolgte. In [65] wird von sensitiveren Assays berichtet unter Verwendung eines längeren Spacerarmes bei der Kopplung an Peroxidase und von sensitiveren Immunoassays mit kürzeren Spacerlängen bei der Verwendung von Alkalischer Phosphatase. In [66] wird von keinem Einfluß des Haptens auf die Lage des  $I_{50}$ -Wertes berichtet. Bei der Tracersynthese für einen atrazinsensitiven Immunoassay sollte das Chlor-Atom am C4-Atom des Triazin-Ringes nicht substituiert werden, da sonst der Tracer nicht mehr erkannt wird [62, 68]. Einen Effekt hat auch die funktionelle Gruppe am C6-Atom (R3 in der allgemeinen Struktur der Triazine). Eine höher verzweigte Gruppe, wie ein Isopropylrest, hat eine höhere Affinität zum Antikörper als eine Ethyl-Gruppe [62]. Zusammenfassend ist zu sagen, daß für unterschiedliche Antikörper der Einfluß des Haptens auf die Lage des  $I_{50}$ -Wertes immer neu zu untersuchen sein wird.

Bei der Beschreibung des Assayablaufs wird immer die tatsächliche Verdünnung einer Komponente angegeben, denn im Wettbewerbsschritt wird die Tracerlösung mit Analytlösung verdünnt, so daß ein Vergleich nur dann möglich ist, wenn die tatsächliche Konzentration an Tracer bekannt ist. Viele Autoren geben in den Veröffentlichung nicht an, ob die tatsächliche Verdünnung oder die im Assay eingesetzte Verdünnung angegeben wurde. Dies macht einen Vergleich von publizierten Assays untereinander schwierig.

### 3.5.4 Vor und Nachteile von Immunochemischen Analysemethoden

Vergleicht man konventionelle Analysemethoden, wie GC/MS oder HPLC mit Immunoassays, können entscheidende Vorteile festgestellt werden:

- Eine Aufkonzentrierung ist in der Regel bei der Verwendung von Immunoassays nicht notwendig.
- Das Probenvolumen liegt im Immunoassay bei 100µL. Es kann noch weiter gesenkt werden, bis hin zu 30µL [67]. Bei konventionellen Methoden liegt das Probenvolumen bei 500-1000mL.
- Der Probendurchsatz ist bei einem Immunoassay durch die Verwendung von Mikrotiterplatten im Vergleich zu konventionellen Analysemethoden höher. Wird eine Kalibrierkurve mit einer Vierfachbestimmung der Standardlösungen (Anzahl 10) aufgenommen, so sind auf einer Mikrotiterplatte noch Platz für 14 weitere Proben in Vierfachbestimmung.
- Der Zeitaufwand für einen Immunoassay liegt bei ca. 2-3 Stunden, bei der Verwendung von vorbeschichteten Mikrotiterplatten.

Nachteile bei der Verwendung von Immunoassays sind die folgenden:

- Durch die Kreuzreaktivität des Antikörpers wird nicht nur ein Stoff detektiert, sondern je nach Ausmaß der Kreuzreaktivität können ganze Substanzklassen erfasst werden. Dies kann bei der Analyse von realen Proben zu falsch positiven Resultaten führen, d.h. ein positives Resultat aus einem Immunoassay sollte noch einmal mit einer konventionellen Methode überprüft werden.
- Die Gefahr ausgehend von Matrixeffekten ist groß. Da im Wettbewerbsschritt des ELISA's Probe und Tracer gemeinsam um die Antikörperbindungsstellen konkurrieren, kann es durch in der Probe gelöste Stoffe zu Beeinflussungen kommen. Es können sogenannte chaotrope Stoffe, wie z.B. Ammoniumsulfat, Thiocyanate, die Antigen-Antikörper-Bindung zerstören. Es kann auch zu einer Inaktivierung des Enzyms kommen, wenn in der Probe

Substanzen enthalten sind, auf die das Enzym empfindlich reagiert. In der Probe enthaltene Huminstoffe können, je nach Konzentration, einen großen störenden Einfluß ausüben.

## 4. pH Messung

### 4.1 Geschichte der pH-Messung

Bereits 1660 soll Robert Boyle Pflanzensäfte zur Herstellung von Indikatorpapieren verwendet haben [40]. Im 19. Jahrhundert wurde von Arrhenius [69] und Ostwald [70] die Ionentheorie mit besonderem Augenmerk auf die Dissoziation des Wassers aufgestellt. Hans Friedenthal gelang es 1904 erstmals eine Skala mit 14 Farbindikatoren aufzustellen, deren Farbumschläge bestimmten Wasserstoffionenkonzentrationen zugeordnet werden [71]. Um beständige Lösungen mit kleinen Wasserstoffionenkonzentrationen herzustellen, führten Friedenthal und Szily [72] Salzsäuregemische ein, die heutigen Pufferlösungen. Die Wasserstoffionenkonzentrationen in diesen Gemischen waren sehr klein und Sørensen [73] schlug vor, die negative Logarithmen dieser Zahlen zu verwenden, den pH-Wert (pondus hydrogenii).

### 4.2 Säure-Base Theorien:

#### 4.2.1 Arrhenius Theorie:

Arrhenius [69] schloß aus der Beobachtung, daß der osmotische Druck und die elektrische Leitfähigkeit von Salzen und starken Säuren und Basen größer gefunden wurde als es vorauszusehen war, auf eine Dissoziation der im Wasser gelösten Elektrolyte in Ionen. Schwache Säuren und Basen dissoziieren nur teilweise. Die Arrheniussche Theorie wird durch Leitfähigkeitsmessungen in Verdünnungsreihen bestätigt. Eine Säure dissoziiert nach dem Schema:



Der Dissoziationsgrad  $\alpha$  ist:

$$\alpha = \frac{c_{\text{H}^+}}{c_{\text{OHA}}} = \frac{c_{\text{A}^-}}{c_{\text{OHA}}} \quad (21)$$

$c_{\text{OHA}}$  ist hierbei die Einwaage der Säure. Angewendet auf das Massenwirkungsgesetz ergibt sich das Ostwaldsche Verdünnungsgesetz:

$$\frac{\alpha^2}{1-\alpha} = \frac{K_a}{c_{\text{OHA}}} \quad (22)$$

Dieses läßt sich durch Messen der Äquivalentleitfähigkeit nachprüfen. Es wird von verdünnten schwachen Säuren und Basen recht gut eingehalten.

Nach der Theorie von Arrhenius sind Säuren und Basen Stoffe, die bei der Dissoziation Wasserstoffionen bzw. Hydroxidionen bilden.

#### 4.2.2 Brønstedtsche Theorie

Nach Brønstedt sind Säuren und Basen Stoffe, die zu einer Abspaltung bzw. Anlagerung von Wasserstoffionen fähig sind. Säuren und Basen, die sich nur durch ein Wasserstoffion unterscheiden, sind korrespondierende Säure-Base-Paare. Die Stärke einer Brønstedt-Säure HA in wäßriger Lösung wird durch die Säurekonstante  $K_A$  ausgedrückt. Sie ergibt sich aus Gleichgewichtskonstante der Protonenübertragung der Säure auf das Wasser: Nach dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich aus der Aktivität der Säure  $a_{\text{HA}}$ :



Gleichermaßen läßt sich die Basenkonstante  $K_B$  definieren:



Beide Konstanten sind über das Ionenprodukt des Wassers miteinander verknüpft:

$$\frac{a_{\text{A}^-} \cdot a_{\text{H}_3\text{O}^+}}{a_{\text{HA}}} \cdot \frac{a_{\text{HA}} \cdot a_{\text{OH}^-}}{a_{\text{A}^-}} = K_B \cdot K_A = K_W \quad (25)$$

Jede Säure gibt ihr Proton an eine Base mit höherer Protonenaffinität, gemäß Massenwirkungsgesetz, ab. In der Brønstedtschen Theorie gibt es den Zusammenhang sauer  $\Leftrightarrow$  basisch nicht mehr. Es existieren nur noch Säuren verschiedener Stärke. Die Brønstedtsche Theorie schließt dabei Systeme ein, die aus nichtwässrigen, aber im engeren Sinne wasserähnlichen, Lösungsmitteln bestehen [74].

### 4.2.3 Lewissche Theorie

Von Lewis werden Säuren und Basen noch allgemeiner definiert. Nach Lewis werden Säuren und Basen nach ihrer Elektronenkonfiguration eingestuft. Säure bedeutet koordinativ ungesättigt und Basen bedeuten ein freies Elektronenpaar. Die Neutralisation bedeutet nach Lewis die Vereinigung eines Elektronenpaarakzeptors mit einem Elektronenpaardonator [75].

### 4.2.4 pH-Wert

Nach heutiger Schreibweise würde man die Skala nach Sørensen folgendermaßen schreiben :

$$\text{pH} = -\lg c_{\text{H}^+} \quad (26)$$

Sørensen merkte später, daß es nicht so sehr auf die Konzentration sondern auf die Aktivität der Wasserstoffionen ankommt. Deswegen liegt neueren Definitionen die Aktivität zugrunde:

$$\text{paH} = -\lg \frac{a_{\text{H}^+}}{a_{\text{H}^+}^0} \quad (27)$$

$a_{\text{H}^+}^0 =$  Wasserstoffionenaktivität 1 mol / L

### 4.2.5 Elektrolyte

#### 4.2.5.1 Wasser

Wasser nimmt in jeder Hinsicht eine Sonderstellung ein. Auffallend ist die geringe Flüchtigkeit im Vergleich zu ähnlichen Verbindungen. Auch besitzt Wasser eine ungewöhnlich hohe Dielektrizitätskonstante. Die in mancher Hinsicht anomalen Eigenschaften des Wasser lassen sich auf die Struktur zurückführen, in der die beiden Wasserstoffatome in einem Winkel von  $104.5^\circ$  angeordnet sind. Aufgrund der unterschiedlichen Elektronegativitäten von Sauerstoff und Wasserstoff ist die Bindung polarisiert und bilden einen Dipol. Wassermoleküle haben dadurch eine große Neigung zur Bildung von Wasserstoffbrücken. Es bilden sich z.B. Tetraeder aus, die noch durch den ähnlichen Winkel von  $104.5^\circ$  der beiden Wasserstoffatome zueinander zum Tetraederwinkel von  $120^\circ$  begünstigt werden. In flüssigem Wasser herrscht ein bestimmter Ordnungszustand. Aus quantenmechanischen Berechnungen und den Ergebnissen aus Röntgen- und Neutronenbeugung, IR- und Ramanspektroskopie wurde das Clustermodell

abgeleitet. In diesem Modell besteht Wasser aus größeren Assoziaten, deren Größe mit steigender Temperatur abnimmt [79].

Im gasförmigen Zustand sollen zum Teil Dimere vorliegen. Im überkritischen Zustand kann Wasser einige normalerweise wasserunlösliche Stoffe lösen und somit zu Extraktionszwecken benutzt werden [40].

#### 4.2.5.2 Das Ionenprodukt des Wassers

Bei Raumtemperatur ist Wasser kaum dissoziiert. Die Dissoziationskonstante beträgt bei 25 °C nur  $K_W = 10^{-14}$  mol/L. Nach Brønstedt ist Wasser als amphoter anzusehen. Wasserstoffionen können in Lösungen nicht als freie Protonen existieren. In Wasser bildet sich das Oxoniumion,  $H_3O^+$ . Das Oxoniumion ist eine flache Pyramide, wie der Ammoniak. Das Oxoniumion lagert noch weitere Wassermoleküle an. Messungen der molaren Wärmekapazität von starken Säuren in wässriger Lösung lässt auf größere Assoziate schließen. Ein Oxoniumion soll dabei von drei Wassermolekülen umgeben sein. Die Wasserstoffbrücken der inneren Sphäre sind dabei in Resonanz. Die Protonen bewegen sich innerhalb eines Clusters entlang der Wasserstoffbrücken durch Tunnelübergänge[76].

Nach Light und Licht [77] hat reinstes Wasser bei 25°C eine elektrische Leitfähigkeit von  $k = 0.05508 \mu\text{S/cm}$ . Mit den Äquivalentleitfähigkeiten

$$\lambda_{H^+} = 350.1 \text{ S cm}^2/\text{mol}$$

$$\lambda_{OH^-} = 199.2 \text{ S cm}^2/\text{mol}$$

ergibt sich eine Wasserstoffionenkonzentration von

$$c_{H^+} = \frac{k}{\lambda_{H^+} + \lambda_{OH^-}} \quad (28)$$

Der Dissoziationsgrad des Wassers ist dann damit:

$$\alpha = \frac{c_{H^+}}{c_{H_2O}} = 1.805 \cdot 10^{-9} \quad (29)$$

und die Säurekonstante nach Brønstedt bei 25°C

$$K_a = \frac{a_{H^+} a_{OH^-}}{a_{H_2O}} = 10^{-15.742} \text{ mol/L} \quad (30)$$

Da die Eigendissoziation des Wassers nur gering ist, kann die Aktivität als konstant angesehen werden. ( $\lg a_{\text{H}_2\text{O}} = 1.745$ ).

Das Ionenprodukt des Wassers ergibt sich damit zu:

$$K_w = a_{\text{H}^+} a_{\text{OH}^-} = 10^{-13.997} \text{ (mol/L)}^2 \quad (31)$$

## 4.2.6 Nernstsches Gesetz

### 4.2.6.1 Aktivitätskoeffizienten

Ionen üben als Träger elektrischer Ladungen auch in geringen Konzentrationen elektrische Kräfte auf die Umgebung aus. Die Lösungen sind zwar makroskopisch neutral, aber im Mikrobereich können die Wechselwirkungen beträchtlich sein. Die Beweglichkeit der Ionen nimmt durch diese Wechselwirkung ab. Um diesem nichtidealen Verhalten Rechnung zu tragen, muß man die Konzentration  $c_i$  mit dem Aktivitätskoeffizienten  $\gamma_i$  multiplizieren. Die Aktivität  $a_i$  ist damit gegeben als:

$$a_i = c_i \cdot \gamma_i \text{ [mol/L]} \quad (32)$$

Die Aktivitätskoeffizienten sind bei kleinen und mittleren Konzentrationen kleiner als 1, erst bei hohen Konzentrationen, wenn das Wasser zur Ausbildung einer Hydrathülle knapp wird, treten Werte größer als 1 auf [79].

### 4.2.6.2 Elektrochemisches Potential

Die Änderung der freien Enthalpie eines Moles einer Substanz beim Übergang von einer Konzentration zu einer anderen kann man schreiben als:

$$\Delta G = nRT \ln \frac{c_2}{c_1} \quad (33)$$

Liegen die betrachteten Konzentrationen im mittleren Bereich, können anstelle der Konzentrationen die Aktivitäten eingesetzt werden:

$$\Delta G = nRT \ln \frac{a_2}{a_1} \quad (34)$$

Differenziert man die freie Enthalpie nach der Stoffmenge  $n_i$  erhält man das chemische Potential  $\mu_i$ .

$$\left( \frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{p,T,n_j \neq i} = \mu_i \quad (35)$$

Unterscheiden sich die chemischen Potentiale in zwei aneinander grenzender Phasen, so können zwischen ihnen chemische Reaktionen ablaufen.

Da Absolutwerte freier Enthalpien und chemischer Potentiale unbekannt sind, kann man nur Veränderungen in Bezug zu einem Ausgangszustand angeben.

$$\mu_i = RT \ln \frac{a_i}{a_i^0} = \mu_i^0 + RT \ln a_i \quad (36)$$

Dabei ist  $a_i^0$  die Standardaktivität des Stoffes  $i$ , die man mit  $c = 1 \text{ mol/L}$  festgelegt hat.

Geht man von ungeladenen Stoffen auf Ionen über, so kann man eine Elektrode als ein Zweiphasensystem betrachten. In diesem System können die Ionen oder Elektronen die Phasengrenze überschreiten. An der Phasengrenze zwischen Elektrode und Lösung wird ein elektrochemisches Potential wirksam.

#### 4.2.7 Die Glaselektrode

Abbildung 4-1 zeigt die schematische Darstellung einer Laborglaselektrode. Die Kugelmembran ist der eigentliche Sensor. Sie ist mit Bezugs elektrolyt gefüllt und mit einer Ableitelektrode versehen. An der Membranoberfläche erfolgt beim Kontakt mit Wasser ein Ionenaustausch, bei dem Alkaliionen gegen Wasserstoffionen ausgetauscht werden. Es entstehen dadurch zahlreiche Hydroxylgruppen. Der Ladungstransport durch die Membran erfolgt nicht durch Wasserstoffionen sondern durch Alkaliionen. An der Phasengrenze Lösung/Glas stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Hydroxyl- und Oxigruppen ein, das von der Wasserstoffionenaktivität in der Lösung abhängt. Damit kann der pH-Wert der Lösung bestimmt werden.

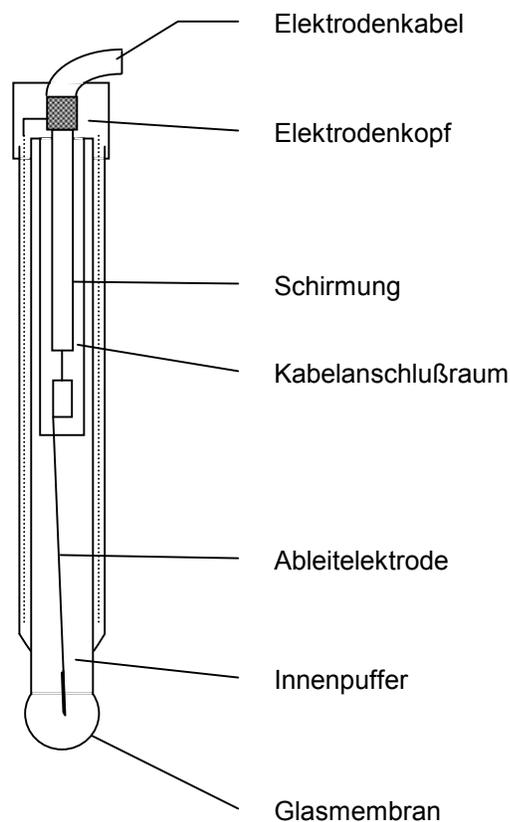


Abb. 4-1 Schematische Darstellung einer Laborglaselektrode.

Als Innenpuffer wird meistens KCl verwendet, da durch KCl die Haltbarkeit des Glases deutlich verlängert wird. Andere Innenpuffer wie z.B. Phosphate können Komplexe mit den Netzwerkbildnern oder Netzwerkwandlern des Glases bilden. Als Ableitelektrode wird häufig die Silber/Silberchlorid-Elektrode in Form eines mit Silberchlorid beschichteten Silberdrahtes verwendet. Die äußere Form der Membran kann variieren, so sind z.B. Flachmembrane oder Einstichmembrane im Handel erhältlich.

Bei der Ableitung der Phasengrenzspannung von äußerer und innerer Auslaugschicht der Membran ist es oft so, daß die ideal angenommene Gleichheit beider Schichten nicht gegeben ist. Es tritt eine Asymmetriespannung auf. Gründe für diese Ungleichheit können sein:

- Änderung der Glaszusammensetzung während der Herstellung.
- Der Innenpuffer verbleibt lange Zeit im Innenraum der Elektrode, und von außen wirken unterschiedliche Lösungen ein.
- Wenn der osmotische Druck zwischen Innenpuffer und Meßlösung zu unterschiedlich ist, ist der Wassergehalt der Auslaugschicht unterschiedlich und damit die Wasserstoffionenaktivität.

- Eine Verschmutzung der äußeren Membran durch die Meßlösung oder durch schwerlösliche Verbindungen im Inneren führen zu einem unterschiedlichen Verhalten der beiden Auslaugschichten.

Die Steilheit einer Glaselektrode ist der Quotient aus der Änderung der Spannung mit der Änderung des pH Wertes:

$$U_N = RT/(F \cdot \lg e) = \Delta U / \Delta \text{pH} \quad (37)$$

Sie sollte idealerweise gleich der Nernstspannung sein. Normalerweise werden nicht ideale Werte gefunden, deswegen ist es für eine Routinemessung unbedingt erforderlich, vor der Messung die Elektrode zu kalibrieren. Bei der Kalibrierung werden Asymmetrie und Steilheit ermittelt und in der nachfolgende Messung miteinbezogen. Die Kalibrierung sollte immer mit DIN Pufferlösungen erfolgen, um die größtmögliche Sicherheit zu haben [78].

Heutzutage werden in einem chemischen Labor in der Regel Einstabmessketten verwendet. Sie bestehen aus einer Glaselektrode mit integriertem Bezugssystem. Damit das Bezugssystem auch Kontakt zur Meßlösung hat, wird ein Diaphragma eingebaut. Für den Routinebetrieb gelten die gleichen Voraussetzungen wie bei der Glaselektrode. Wird bei einer solchen Einstabmesskette festgestellt, daß Steilheit und Asymmetrie zu stark von den idealen Werten abweichen, hat das meist die Ursache in stark verschmutzten Diaphragmen. Meist kann eine Verbesserung der Kalibrierung durch Reinigung der Elektrode erfolgen. Oft wird eine 2M HCl eingesetzt, um Calciumcarbonat oder Schwermetallhydroxide zu lösen. Bei proteinhaltigen Verschmutzungen hilft eine Pepsin/HCl-Lösung. Ein Beizen der Membranoberfläche ist nicht zu empfehlen, da dadurch die Oberfläche aufgeraut und so leichter anfällig für Verschmutzungen wird. Die Lebensdauer einer Glaselektrode beträgt ca. 1 Jahr. Danach verlängert sich die Einstelldauer so sehr, daß sie für praktische Messungen nicht mehr verwendet werden kann.

#### 4.2.8 pH Indikatoren

Es existiert eine Vielzahl von Farbstoffen, die auf unterschiedliche pH Werte mit einer Farbveränderung reagieren. In [79] sind viele dieser Farbstoffe aufgezählt. Die meisten von ihnen haben nur einen Umschlagspunkt, d.h., daß sie die Farbe aufgrund einer pH-Änderung ändern. Es gibt aber auch Farbstoffe, welche eine Abnahme oder Zunahme der Absorption oder Fluoreszenz im Maximum in Abhängigkeit vom pH-Wert zeigen. Eine gute Übersicht über diese Farbstoffe liefert das "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals" [80]. In

der vorliegenden Arbeit wurde 8-Hydroxypyren-trisulfonsäure-trinatriumsalz (HPTS) als Farbstoff ausgewählt. Der eingesetzte Farbstoff sollte folgenden Eigenschaften haben:

- Er sollte gut in Wasser löslich sein.
- Er sollte ein Absorptionsmaximum bei Wellenlängen haben, für den im ELISA-Reader ein Filter existiert.
- Er sollte seinen Umschlagspunkt in einem pH-Bereich haben, der mit dem pH-Optimum des eingesetzten Enzyms übereinstimmt.

HPTS erfüllt alle diese Kriterien. HPTS ist sehr gut löslich in Wasser. Es besitzt ein Absorptionmaximum bei 450 nm. Der pH-Bereich ist 6-8.

Abbildung 4-2 zeigt für HPTS die Abhängigkeit der Absorption von dem pH-Wert. Für die Messung wurden Phosphat-Puffer mit verschiedenen pH-Werten hergestellt. Die Konzentration an HPTS war 22.2  $\mu\text{M}$ . Die Untersuchungen sind in Anlehnung an [81] durchgeführt worden.

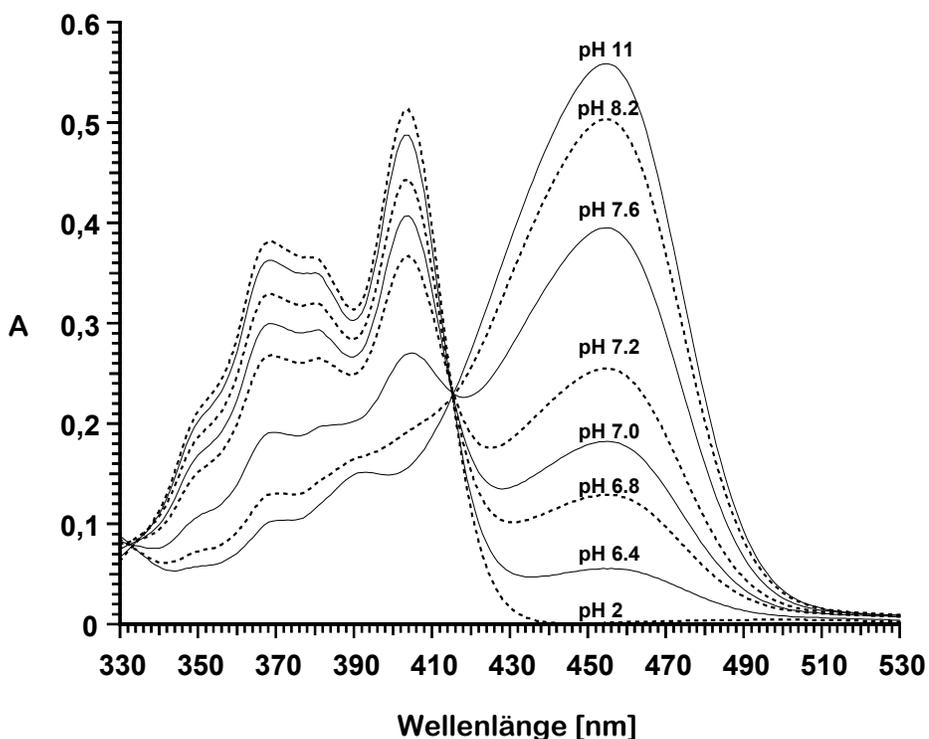


Abb. 4-2 Absorptionsspektren von HPTS bei verschiedenen pH-Werten.

Abbildung 4-3 zeigt die Abhängigkeit der Absorption von HPTS im Maximum (450 nm) vom pH-Wert.

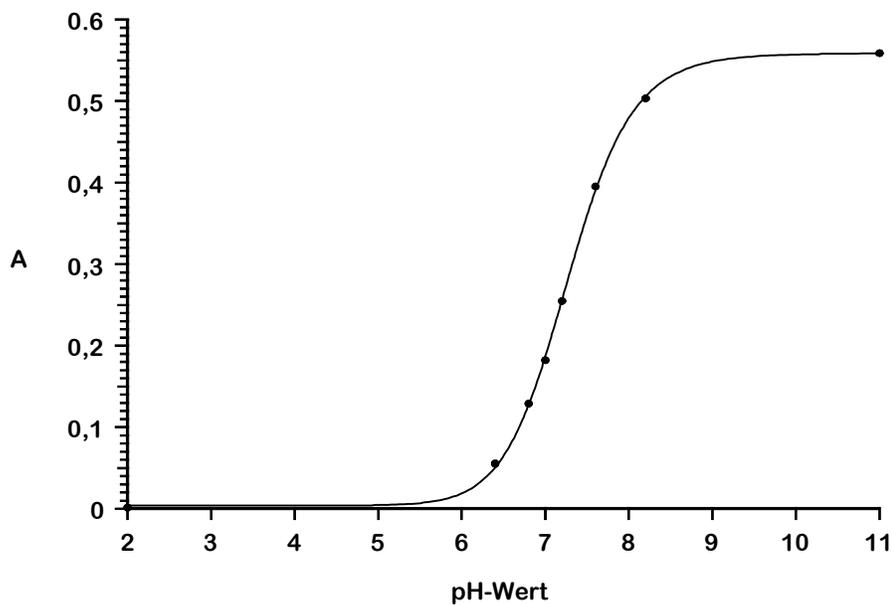


Abb. 4-3 Abhängigkeit der Absorption von HPTS im Maximum (450 nm) vom pH-Wert.

Zwischen pH 8.2 und 6.4 ist ein steiler Abfall in dem Absorptionsmaximum zu verzeichnen. Dies sollte die Messungen von kleinen Änderungen im pH-Wert möglich machen.

## 5. Das Herbizid Atrazin

Atrazin gehört zu den in der Welt am häufigsten verwendeten Herbiziden. Es kann als Vor- oder Nachlaufherbizid eingesetzt werden. Ein großer Vorteil von Atrazin ist, daß oft eine einmalige Applikation für die ganze Pflanzsaison ausreichend ist, da das Herbizid 4-6 Wochen persistent im Boden bleibt. Daraus resultieren auch weitreichende Probleme, auf die später kurz eingegangen werden soll. Der Hauptanwendungsbereich liegt im Mais-, Reis-, Spargel-, Ananas- und Zuckerrohranbau zur Bekämpfung breitblättriger Unkräuter. Oft wird Atrazin als unspezifisches Herbizid gegen Unkräuter z.B. entlang Straßen und Eisenbahnschienen [82] eingesetzt. In Deutschland ist die Verwendung seit dem 1.4.1991 verboten.

Atrazin gehört zu der Klasse der Triazinherbizide. Abbildung 5-1 gibt einen Überblick über die Strukturen einiger verwendeter Triazinherbizide und Metaboliten.

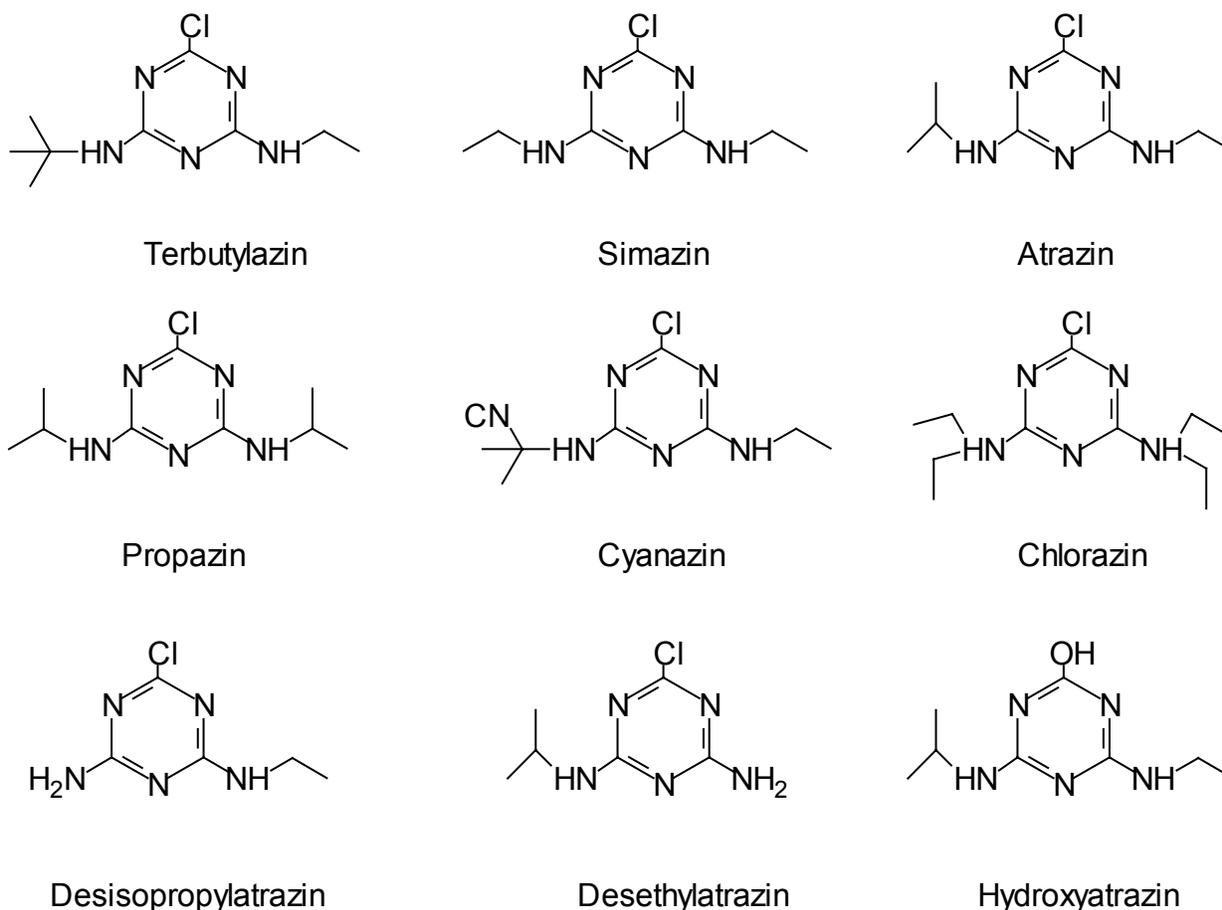


Abb. 5-1 Strukturen von Triazinherbiziden und Atrazinmetaboliten.

Die Triazinherbizide werden hauptsächlich über die Wurzeln und die Blätter in die Pflanze aufgenommen. Die Metabolisierung erfolgt über drei Wege: N-Dealkylierung der Seitenkette, hydrolytische Dehalogenierung und Konjugation mit Glutathion. Diese Wege sind interaktiv, d.h. Produkte der einzelnen Metabolisierungswege können noch weiteren Abbau durch die anderen Abbauwege erfahren. In Atrazin erfolgt die Dealkylierung des Ethyl-Restes eher als die des Isopropyl-Restes. Durch die N-Dealkylierung verliert Atrazin einen Teil seiner Phytotoxizität. Sind beide Seitenketten abgespalten, ist ein totaler Verlust der Phytotoxizität zu verzeichnen. Die Enzyme, welche die Dealkylierung der s-Triazine katalysieren, sind bis jetzt noch nicht intensiv untersucht worden, es gibt aber Anhaltspunkte, daß es Cytochrom P450 Monooxygenasen sind. S-Triazine mit hochverzweigten Seitenketten werden eher durch hydrolytische Dehalogenierung metabolisiert als durch N-Dealkylierung.

Nicht nur Pflanzen sind in der Lage Atrazin über N-Dealkylierung zu metabolisieren, sondern auch Tiere und Mikroorganismen.

Die hydrolytische Dehalogenierung war der erste Metabolisierungsweg, der für 2-Chlor-Triazine gefunden wurde. Auch hier ist eine Verlust der Phytotoxizität zu verzeichnen. Interessant ist hierbei, daß das Ausmaß der Metabolisierung durch Dehalogenierung vom Aufnahmeweg abhängt. Wird Atrazin durch die Wurzeln aufgenommen, findet eine Dehalogenierung zu 38-65% statt, währenddessen bei einer Aufnahme durch die Blätter diese Reaktion nur noch zu 10-25% stattfindet. Die Konjugation mit Glutathion ist der Hauptmetabolisierungsweg bei einer Aufnahme durch die Blätter. Die Reaktion wird katalysiert durch Glutathion-S-Transferase [83]. Aufgrund der langjährigen Applikation von Triazinen sind viele Pflanzen resistent geworden. 1998 waren 59 verschiedene Spezies bekannt [84]. Bei den resistenten Pflanzen erfolgt die Metabolisierung hauptsächlich durch Konjugation mit Glutathion [83].

Viele Mikroorganismen haben Atrazin als eine Stickstoffquelle für ihren Metabolismus erschlossen [85]. Einige Bakterien der Pseudomonas-Gruppe bauen Atrazin in Konzentrationen größer als 1000µg/L ab. Sie verwenden Atrazin als alleinige Quelle für Stickstoff. Nach 15h ist 80% des Atrazins abgebaut, und nach 25h sind es 100% [86]. In Säugetieren sind die Hauptmetabolite die N-Dealkylierten Verbindungen. Hydroxyatrazin scheint in Tieren als Metabolit nicht aufzutreten [87].

Atrazin hat aufgrund von Tierversuchen nur eine leichte akute Toxizität. Der LD<sub>50</sub>-Wert (Letale Dosis für 50% der untersuchten Tiere) liegt bei 3000mg/kg für Ratten. Die meisten Tests auf Mutagenität waren negativ (32negativ/38gesamt). Atrazin scheint eine bestimmte Art des Gebärmutterkrebses in Ratten zu fördern. Untersuchungen über das onkogene Potential beim Menschen stehen noch aus [88,89].

Dabei ist eine Gefährdung des Menschen nicht auszuschließen. Bei der Applikation von Atrazin gelangt nicht 100% des Wirkstoffes in die Pflanze. Wird der Wirkstoff versprüht, können nicht unwesentliche Anteile in die Atmosphäre gelangen. Die drei Hauptwege für die Verbreitung in der Atmosphäre sind Verdunstung, Partikeltransport und physikalische Verdriftung. Viele Studien zeigen, daß die Verdunstung den größten Beitrag bei der Verbreitung in der Luft spielt, gefolgt von dem Partikeltransport [5]. Durch den Transport in der Atmosphäre können dann weitere Gebiete mit Atrazin und dessen Metaboliten in Kontakt kommen. Atrazin wird aus der Atmosphäre mit dem Regen ausgewaschen und kann so in Oberflächenwasser eingetragen werden [5,90]. In [2] wird die Halbwertszeit von Atrazin in der Atmosphäre 19h angegeben, aber es ist davon auszugehen, daß die Halbwertszeit stark von den Bedingungen in der Atmosphäre abhängt. Abbauprodukte des Atrazins sind vor allem Desethylatrazin und Desisopropylatrazin. Diese Metaboliten können meist 2 Wochen nach dem Auftreten von Atrazin in Niederschlägen nachgewiesen werden [91].

Ein großer Teil des ausgebrachten Pflanzenschutzmittels wird direkt bei der Applikation in den Boden eingetragen. Treten Niederschläge kurz nach der Ausbringung auf, kann nicht aufgenommener Wirkstoff von der Pflanze in den Boden gelangen und von dort in das Grund- und Oberflächenwasser eingetragen werden. Der Transport durch den Boden erfolgt hauptsächlich durch Makroporen, die von Regenwürmern oder abgestorbenen Wurzelteilen ausgebildet werden. Werden die Felder nicht gepflügt, ist der Eintrag in das Grund- und Oberflächenwasser größer, da die Makroporen über längere Zeit intakt bleiben [92]. Desweiteren kann Atrazin im Boden gebunden bleiben, wobei die Mechanismen, nach denen die Fixierung erfolgt, noch nicht ganz geklärt sind. Es scheinen Huminsäuren eine große Rolle bei der Komplexbildung zu spielen [93].

Der Nachweis von Atrazin erfolgt meistens durch traditionelle Methoden wie Gaschromatographie (GC) und Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC). Die Detektion erfolgt im Falle der Gaschromatographie mittels eines Stickstoff-Phosphor-Detektors (NPD), eines Flammen-Ionisationsdetektors (FID) oder durch die Kopplung mit einem Massenspektrometer. Wird eine Flüssigchromatographie eingesetzt, werden häufig UV/VIS Detektoren zur Bestimmung eingesetzt.

In den meisten natürlichen Wasserproben wird Atrazin in Konzentrationen gefunden, die unterhalb der Bestimmungsgrenzen der gaschromatographischen oder flüssigchromatographischen Nachweismethoden liegen. Deswegen ist bei einem Einsatz dieser Methoden ein Aufkonzentrierungsschritt notwendig. Dabei kommt häufig die Festphasen-Extraktion zum Einsatz. Durch die Notwendigkeit der Aufkonzentrierung werden bei diesen

Analysenverfahren größere Probenvolumina benötigt. Tabelle 5-1 soll einen Querschnitt über für Atrazin entwickelte Analysenverfahren geben.

Methode	Probevolumen	Detektionslimit	Aufkonzentrierung	Bemerkung	Referenz
IASPE-GC	10ml	170 pg (FID) 15 pg (NPD)	IASPE	Die Immunoaffinitätssäule ist mit dem Antikörper K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> versehen.	[94]
HPLC	250ml	9.3µg/L	SPE	C <sub>18</sub> -Säule für die SPE	[95]
GC-MS	200ml	0.005µg/L	SPE	RP-C <sub>18</sub> Säule für die SPE	[96]
GC-MS	10ml	0.1µg/L	SPE	Für die Extraktion werden keine chlorhaltigen Lösungsmittel benötigt	[97]
MS	2g Boden	201 pg	SFC	Das Massenspektrometer wurde im APCI Modus betrieben	[98]
LC-MS	20g Substanz	1-5µg/L	Extraktion	Diese Methode wurde zur Bestimmung von Triazinen in Lebensmitteln verwendet	[99]
GC-MSD	500ml	0.05µg/L	Extraktion	MSD wurde im SIM modus ausgeführt	[100]
LC-MS	4L	0.001µg/L	SPE	Carbograph4 als Füllung für die SPE-Säulen	[101]
GC	25ml 10g Sediment	0.05µg/L 0.5µg/L	SPE	C <sub>18</sub> -Säule für die SPE	[102]
LC-LC	2ml	0.1-0.5µg/L	--	Das Volumen von 2 ml wurde ohne Aufkonzentrierung verwendet	[103]
LC-MS	100ml	2µg/L	SPE	Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte im ESI Modus	[104]
GC-MS	1L	0.7ng/L- 3.3ng/L	SPE	Die Detektionslimits wurden aufgrund von gespiketen Proben erhalten. Die Detektionslimits variierten deutlich mit der Menge an zugesetztem Atrazin und der Matrix.	[105]
SFC-DAD	30ml	0.01µg/L	SPE	Sperisorb ODS-2 für die SPE	[106]
LC-DAD	100ml	0.1µg/L	SPE	S-DVB Empore disk für die SPE	[107]
GC	1L	0.12ng	Extraktion	Extraktion mit Methylenchlorid	[108]
LC-FL	100g	1.2ng/g	Extraktion	Extraktion aus Boden mit MeOH	[109]
GC	250ml	0.049µg/L	SPE	C <sub>18</sub> -Säule für die SPE	[110]
GC-MS	125ml	0.05µg/L	SPE	C <sub>18</sub> -Säule für die SPE	[111]

GC Gaschromatographie; MS Massenspektrometrie; LC Flüssigchromatographie; FL Fluoreszenzdetektion; SFC Überkritische-Flüssigkeits-Chromatographie; MSD Massenselektive Detektion, DAD Diodenarray-Detektor; SPE Festphasen Extraktion; IASPE Immunoaffinitäts-Festphasen-Extraktion; SIM Selektiver Ionen Modus; S-DVB; RP Reversed Phase; HPLC Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie; ESI Elektrospray-Ionisation; MeOH Methanol

Tab. 5-1 Übersicht über entwickelte Analysenverfahren zur Atrazinbestimmung

In den letzten Jahren sind viele Biosensoren und Immunosensoren entwickelt worden, welche eine Bestimmung von Atrazin ermöglichen. Ein großer Vorteil dieser Methoden ist, daß sie oft ohne Anreicherungsschritt durchgeführt werden können. Bei der Verwendung von Immunosensoren ist durch die Kreuzreaktivität des Antikörpers ein Screening auf verschiedene Triazinherbizide möglich. Tabelle 5-2 gibt eine Aufstellung über die zur Bestimmung von Atrazin entwickelten Biosensoren und Immunosensoren.

Methode	Detektionslimit	Analyt	Bemerkung	Detektion	Referenz
Flow-Through Immunosensor	0.7µg/L	Atrazin	pAk	Fluoreszenz	[112]
Immunosensor	0.012µg/L	Atrazin	mAk(K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> )	elektrochemisch	[113]
Immunosensor	0.007µg/L	Atrazin	pAk	Fluoreszenz	[114]
Immunosensor	~1.5µg/L abgeschätzt	Atrazin	IgG	RET	[115]
Biosensor	860µg/L	Atrazin	--	amperometrisch	[116]
PASA	0.037µg/L	Atrazin	mAk(K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> )	Chemilumineszenz	[117]
Immunosensor	0.01µg/L	Atrazin	pAk	Quarzkristall	[118]
Akustischer Sensor	430µg/L	Atrazin	MIP	Oberflächenwellen	[119]
Immunosensor	1.25µg/L	Atrazin	pAk	ISFET	[120]
Immunosensor	21.6µg/L	Atrazin	pAk	amperometrisch	[121]
PASA	0.04µg/L	Atrazin	mAk (4A54)	Chemilumineszenz	[122]
Immunoelktrode	0.020µg/L	Atrazin	pAk	potentiometrisch	[123]
Immunosensor	1µg/L	Atrazin	pAk	resonanter Spiegel	[124]
Immunosensor	9µg/L	Atrazin	mAk	amperometrisch	[125]
Immunosensor	1µg/L	Atrazin	mAk(K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> )	amperometrisch	[126]
Immunosensor	0.05µg/L	Atrazin	mAk	SPR	[127]
Biosensor	0.1µg/L	Atrazin	--	SPR	[128]
Biosensor	2.1µg/L	Atrazin	<i>Chlorella vulgaris</i> Algen	faseroptisch	[129]
Biosensor	20µg/L abgeschätzt	Atrazin	<i>Scenedesmus subpicatus</i> Algen	faseroptisch	[130]
Immunosensor	1µg/L	Atrazin	pAk	amperometrisch	[131]

ISFET ionenselektiver Feldeffekttransistor; MIP Molekular geprägte Polymere; SPR Oberflächenresonanz; pAK polyklonaler Antikörper; mAk monoklonaler Antikörper; PASA paralleler Affinitätssensor Array; RET resonanter Energietransfer; IgG Immunglobulin G;

Tab. 5-2 Überblick über entwickelte Biosensoren und Immunosensoren zur Bestimmung von Atrazin.

Mit der Entwicklung verschiedener Antikörper gegen Atrazin ist auch die Anzahl an immunochemischen Nachweismethoden gestiegen. Tabelle 5-3 soll eine Übersicht über bereits entwickelte immunochemische Analysenmethoden geben.

Methode	Detektionslimit	Bemerkung	Detektion	Referenz
ELISA	0.03µg/L	pAk	HRP	[132]
ELISA	0.001µg/L	pAk	HRP	[133]
ELISA	0.3µg/L	mAk (K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> )	HRP	[134]
ELISA	0.2µg/L	mAk (K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> )	HRP	[135]
Magnetpartikel IA	0.043µg/L	mAk	C-14	[136]
IA	0.2µg/L	pAk	Fluoreszenz	[137]
Durchfluß-IA	0.3µg/L	pAk	Fluoreszenz	[138]
IA	0.4µg/L	mAk (K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> )	Fluoreszenz	[139]
FI Immunotitration	0.5µg/L	mAk (K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> )	RifS	[140]
FIIAA	0.02µg/L	mAk (K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> )	Fluoreszenz	[141,142]
ELISA	0.02µg/L	pAk	HRP	[143]
ELISA	0.0092µg/L	pAk	Kit	[144]
ELISA	0.006µg/L	mAk	HRP	[145]
EFIA	0.056µg/L	pAk	β-Gal	[146]
Magnetpartikel EIA	0.0015 µg/L	pAk	HRP	[147]
Fluoreszenz IA	0.05µg/L	pAk	Fluoreszenz	[148]
ELISA	0.08µg/L	pAk	HRP	[149]

IA Immunoassay; ELISA enzymatischer Festphasenimmunoassay; FI Fließinjektion; FIIAA Fließinjektionsimmunoaffinitätsanalyse; EIA Enzymimmunoassay; EFIA Fließinjektionsenzymimmunoassay; β-Gal β-Galactosidase, RifS reflektometrische Interferenz Spektroskopie; HRP Meerrettich Peroxidase; mAk monoklonaler Antikörper; pAk polyklonaler Antikörper

Tab. 5-3 Übersicht über bereits entwickelte immunochemische Analysenmethoden für Atrazin.

## 6. $\beta$ -Lactamase I (EC 3.5.2.6)

1940 wurde von Abraham und Chain [150] ein hitzelabiler Faktor in penicillinresistenten Bakterienstämmen gefunden, der die wachstumshemmende Wirkung von Penicillin zerstörte. Sie kamen zu dem Schluß, daß es sich um ein Enzym handeln mußte, welches sie Penicillinase nannten. Mit der Entwicklung und Erforschung neuer Antibiotika kam man zu der Erkenntnis, daß die Bezeichnung Penicillinase zu eng gefasst ist. Es wurde daher der Name in  $\beta$ -Lactamase geändert.

$\beta$ -Lactamasen sind eine Enzymklasse, welche die C-N Bindung des  $\beta$ -Lactamringes in  $\beta$ -Lactamantibiotika spaltet. Die Bezeichnung  $\beta$ -Lactamase benennt eine Vielzahl von Enzymen, die von verschiedenen Organismen gebildet werden. Diese Enzyme unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Substratspezifität und ob sie einen Co-Faktor benötigen oder nicht.

$\beta$ -Lactamasen sind die Hauptursache für Antibiotikaresistenzen in der modernen Medizin.

### 6.1 Struktur von $\beta$ -Lactamase

Das in dieser Arbeit verwendete Enzym ist eine Präparation aus *Bacillus cereus*. Es hat ein Molekulargewicht von 33,322 D. Die Anzahl der verschiedenen Aminosäuren ist 306. Die Zusammensetzung der einzelnen Aminosäuren ist in der folgenden Tabelle 6-1 aufgeführt [151]:

Aminosäure	Anzahl	Aminosäure	Anzahl
Alanin	30	Glutamin	8
Leucin	23	Serin	19
Arginin	12	Glutaminsäure	21
Lysin	28	Threonin	24
Asparagin	17	Glycin	25
Methionin	6	Tryptophan	3
Asparaginsäure	16	Histidin	4
Phenylalanin	8	Tyrosin	8
Cystein	1	Isoleucin	26
Prolin	9	Valin	18

Tab. 6-1 Aminosäurezusammensetzung von  $\beta$ -Lactamase.

Diese Information ist wichtig, da nur bestimmte Aminosäuren für die Modifikation des Enzyms verwendet werden können.

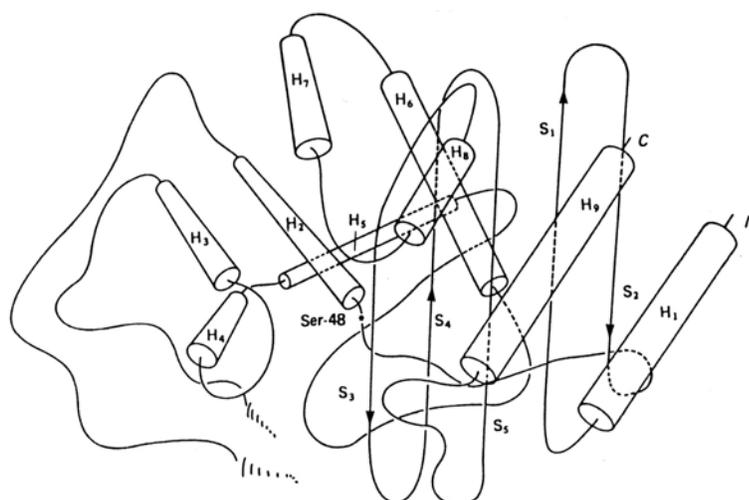


Abb. 6-1 Struktur von  $\beta$ -Lactamase I; Ser 48 ist das aktive Zentrum [152].

## 6.2 Antibiotika

### 6.2.1 Allgemeine Eigenschaften

Antibiotika sind wichtige Substanzen in der Medizin. Die meisten Antibiotika werden von Mikroorganismen produziert und wirken auf andere Mikroorganismen wachstumshemmend oder in manchen Fällen sogar abtötend. Obwohl schon 1877 von Luis Pasteur die antibiotische Wirkung einiger *Escherichia Coli* Bakterien auf eine Anthraxkultur entdeckt wurde, dauerte es noch bis zum Beginn des Zweiten Weltkrieges, bis die antibakterielle Wirkung mehr in den Mittelpunkt des Interesses rückte. Eines der wichtigsten Antibiotika ist das Penicillin. Es wurde 1929 von Alexander Fleming entdeckt [153].

Das Einsatzgebiet der Antibiotika ist nicht nur die Bekämpfung von pathogenen Keimen, sondern auch in der Chemotherapie von Tumorzellen und in der Landwirtschaft. Im Laufe der Jahre sind über 10000 verschiedene Antibiotika beschrieben worden, davon sind 6100 näher charakterisiert worden. Aber nur ca. 200 sind für den veterinären und menschlichen Gebrauch zugelassen worden [154].

Tabelle 6-2 gibt einen kurzen Überblick über die wichtigsten Antibiotika-Klassen.

Bezeichnung	Wichtigste Vertreter
Aminoglycoside	Streptomycin, Gentamycin, Neomycin
Ansamacrolide	Rifampin
$\beta$ -Lactame	Penicillin, Cephalosporin, Carbapenem, Clavulansäure
Chloramphenicol	Chloramphenicol
Glycopeptide	Vancomycin
Lincomycin	Clindamycin
Macrolide	Nystatin, Erythromycin
Polyether	Monensin, Lasalocid
Tetracycline	Tetracyclin, Doxycyclin

Tab. 6-2 Übersicht über die wichtigsten Antibiotika-Klassen [154].

Die  $\beta$ -Lactamantibiotika gehören zu den kommerziell wichtigsten Vertretern der Antibiotika. Penicilline haben einen Marktanteil von 14%, Cephalosporine von 48 % (1989) [154].

In Abbildung 6-2 und 6-3 sind die Formeln, der zwei wichtigsten Antibiotika dieser Klasse aufgezeichnet.

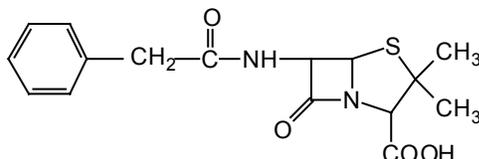


Abb. 6-2 Penicillin G [153]

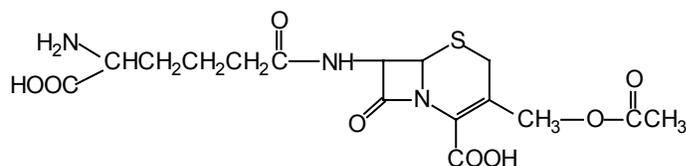


Abb. 6-3 Cephalosporin C [153]

Es bestehen große Unterschiede im antibiotischen Spektrum zwischen Penicillinen und Cephalosporinen. Penicilline wirken gegen fast alle gram-positiven Mikroorganismen. Gram-negative Mikroorganismen sind nicht so stark betroffen. Bei den Cephalosporinen ist es umgekehrt. Sie besitzen die größte Wirksamkeit gegen gram-negative Organismen. Gegen Viren, Pilze und Hefen haben Penicilline keine Wirkung. Eine wichtige Eigenschaft der Cephalosporine ist, daß sie weitgehend durch  $\beta$ -Lactamase nicht abgebaut werden.

In der Klasse der  $\beta$ -Lactamantibiotika ist ihrer antibakterielle Wirkung auf die Hemmung der Bakterien-Zellwandbiosynthese zurückzuführen [155].

### 6.3 Reaktion der $\beta$ -Lactamase

Die Reaktion der  $\beta$ -Lactamase beruht auf der Spaltung des  $\beta$ -Lactamringes in den verschiedenen  $\beta$ -Lactamantibiotika [156]. Zuerst erfolgt eine Anlagerung des Enzyms an den  $\beta$ -Lactamring durch einen Serinrest im aktiven Zentrum. Die Spaltung erfolgt über zwei Schritte. Zuerst findet eine Acylierung statt, die von einer Hydrolyse gefolgt wird. Nach der Hydrolyse liegt das Enzym wieder in seinem Ausgangszustand vor. Abbildung 6-4 zeigt die Reaktion schematisch.

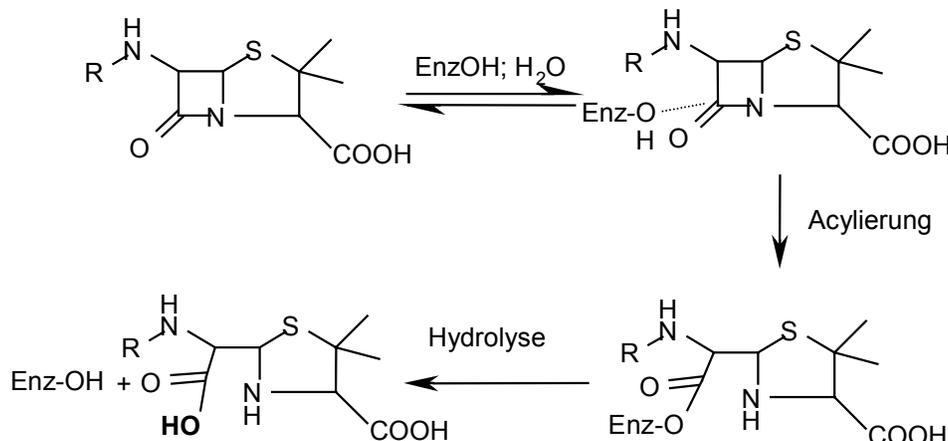


Abb. 6-4 Schematische Darstellung der Enzymreaktion der  $\beta$ -Lactamase.

Nach der Reaktion hat sich eine neue Säuregruppe gebildet. Penicillin G wird damit zu Penicillinsäure umgesetzt. Diese Reaktion lässt sich mittels eines pH-Meters verfolgen.

### 6.4 Kinetische Parameter

Die Reaktion der  $\beta$ -Lactamase folgt einer Kinetik nullter Ordnung. Über weite Substratkonzentrationen zeigt die Reaktion Michaelis-Menten-Kinetik [157], vgl Kapitel 2.2.2.1.

$K_M$  liegt bei 65-73  $\mu M$ ,  $k_{cat}$  wird mit 1920-2200  $s^{-1}$  angegeben [158,159].

## 6.5 Inhibitoren

Die Hemmung der  $\beta$ -Lactamase durch Penicillinsäure ist nur gering. Ein potenter Inhibitor ist die Clavulansäure [160]. Sie wird auch in der Medizin eingesetzt, wenn die Behandlung von penicillinresistenten Keimen erfolgen soll. 6 $\beta$ -Brompenicillinsäure hemmt das Enzym, indem es das aktive Zentrum als schlechtes Substrat blockiert [161]. Methicillin und Cloxacillin inaktivieren das Enzym über den gleichen Mechanismus [162]. Phenylpropynal inaktiviert das Enzym, indem es eine Reaktion mit dem Serin im aktiven Zentrum eingeht [163]. Einen guten Überblick über die zur Zeit einsetzbaren Inhibitoren in der Behandlung von penicillinresistenten Keimen gibt Page in [164].

Es sind nur wenige Inhibitoren im Bereich der Ionen bekannt. Calcium hemmt die Aktivität der  $\beta$ -Lactamase zu 65% bei einer Konzentration von  $6.0 \cdot 10^{-3}$  M. Eisen(II) hemmt  $\beta$ -Lactamase zu 95% bei einer Konzentration von  $8.9 \cdot 10^{-4}$  M.

## 6.6 Allgemeine Eigenschaften der $\beta$ -Lactamase

$\beta$ -Lactamase hat die Eigenschaft sich leicht an Glassoberflächen anzulagern. Diese Eigenschaft ist oft zur Aufreinigung des Enzyms verwendet worden. Dialyse hat auf die Aktivität der  $\beta$ -Lactamase keinen Einfluß [165].

## 6.7 Anwendungsmöglichkeiten von $\beta$ -Lactamase

Das Enzym  $\beta$ -Lactamase ist in den späten siebziger Jahren als Enzymlabel eingeführt worden [166]. Seine Anwendungen im ELISA beziehen sich hauptsächlich auf ELISA-Systeme in der medizinischen Diagnostik, wie z.B. in die Bestimmung von Testosteron [167,168] und  $\alpha$ -Interferon [4]. Sehr häufig wird  $\beta$ -Lactamase eingesetzt, um Penicillin-Konzentrationen zu bestimmen. Die Methoden waren zuerst iodometrische Analysen, bei denen Penicillin über eine Iod-Stärke Reaktion nachgewiesen wurde [170]. Sehr häufig wird  $\beta$ -Lactamase in verschiedenen Biosensoren zur Bestimmung von Penicillin G eingesetzt. So sind verschiedene Biosensoren zur Bestimmung von Penicillin G entwickelt worden. Es sind Biosensoren unter Immobilisierung der  $\beta$ -Lactamase durch Polymermembranen an die Glasoberfläche einer Glaselektrode [171,172] oder unter Verwendung eines pH sensitiven Feldeffekttransistors [173] entwickelt worden. Es sind verschiedene Durchflußsysteme zur Bestimmung von Penicillin G unter Verwendung von  $\beta$ -Lactamase beschrieben worden [174,175]. Ein Durchflußsystem ist entwickelt worden, wobei die Menge an Penicillin G durch die Reaktionswärme der Enzymreaktion detektiert wurde [176].

## 7. Praktischer Teil:

### 7.1 Einleitung:

In der vorliegenden Arbeit sollte ein neuer Immunoassay unter Verwendung von  $\beta$ -Lactamase als Enzymlabel des Tracers erarbeitet werden. Dieser Immunoassay sollte dann auf Polystyrol-Mikropartikel übertragen werden. Als Endziel sollte eine Messung der Menge an gebundenem Enzymtracer unter Verwendung von  $\beta$ -Lactamase mittels einer pH-Elektrode stehen, so daß der entwickelte Immunoassay nicht mehr von speziellen Laborgeräten, wie z.B. einem EIA-Reader abhängig ist.

Zuerst mußte untersucht werden, ob eine Kopplung der  $\beta$ -Lactamase an die Haptene, ohne eine Deaktivierung des Enzyms, möglich ist. Desweiteren muß der hergestellte Tracer in der Lage sein, in Abhängigkeit von der Konzentration des Analyten, dessen Bindung an den Antikörper zu unterbinden. Der hergestellte Tracer sollte eine gute Lagerfähigkeit besitzen, da mit einem Traceransatz auch die Übertragung auf die Polystyrol-Mikropartikel erfolgen sollte. Außerdem sollte ein guter Testmittelpunkt, eine gute Reproduzierbarkeit und Sensitivität erreicht werden.

In dem folgenden Kapitel werden die unterschiedlichen Tracersynthesen beschrieben.

### 7.2 Enzymkinetik

Um die am besten geeignete Konzentration an Penicillin G herauszufinden, wurden mit dem EIA-Reader im Kinetik Modus verschiedene kinetische Messungen durchgeführt. Es wurden verschiedene Konzentrationen an Penicillin G als Substratlösungen verwendet. Die Substratlösungen bestanden aus verschiedenen Volumina einer Penicillin G- Stammlösung bzw. wurden aus Substratlösungen hergestellt mit höherer Konzentration an Penicillin G: die genauen Zusammensetzungen sind im Anhang aufgeführt. Den jeweiligen 5mL Substratlösung wurden 30 $\mu$ L HPTS und 75 $\mu$ L Carbonatpuffer zugesetzt. Die Anteile an HPTS und Carbonatpuffer waren gleichbleibend, nur der Anteil an Penicillin G wurde variiert. Für diese Messungen wurden 0.26mg  $\beta$ -Lactamase in 0.5mL Carbonat-Puffer gelöst. Diese Lösung wurde nochmals 1:3 mit dest. Wasser verdünnt, da ansonsten die Enzymreaktion zu schnell ablaufen würde und nicht mehr mittels des EIA-Readers vermessen werden konnte. In Mikrotiterplatten wurden 200  $\mu$ L der Substratlösung vorgelegt und 5  $\mu$ L der Enzymlösung dazu pipetiert. Die Substratlösung ohne Enzym wurde auch vermessen, damit eine Drift des Signals aufgrund der Messbedingungen ausgeschlossen werden kann. Die folgenden Abbildungen 7-1 bis 7-3 zeigen die Ergebnisse, die mit 6 verschiedenen Penicillin G Konzentrationen erhalten wurden.

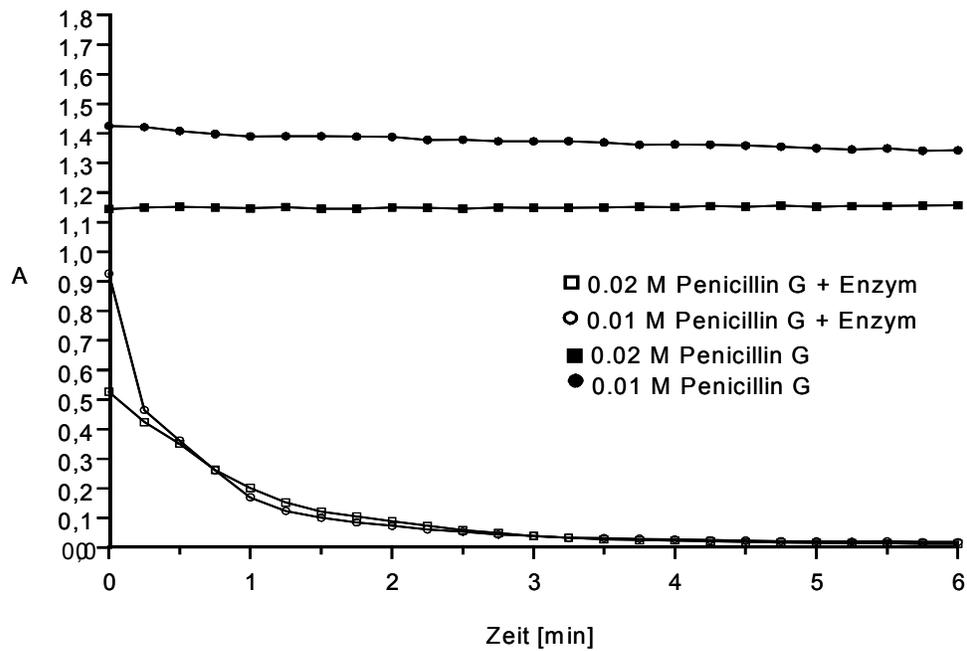


Abb. 7-1 Kinetische Messungen mit dem Enzym  $\beta$ -Lactamase bei 0.02M und 0.01M Penicillin G Konzentration der Substratlösungen. Die Verdünnung durch die Zugabe von 5 $\mu$ L Enzymlösung zu 200 $\mu$ L Substratlösung wurde vernachlässigt.

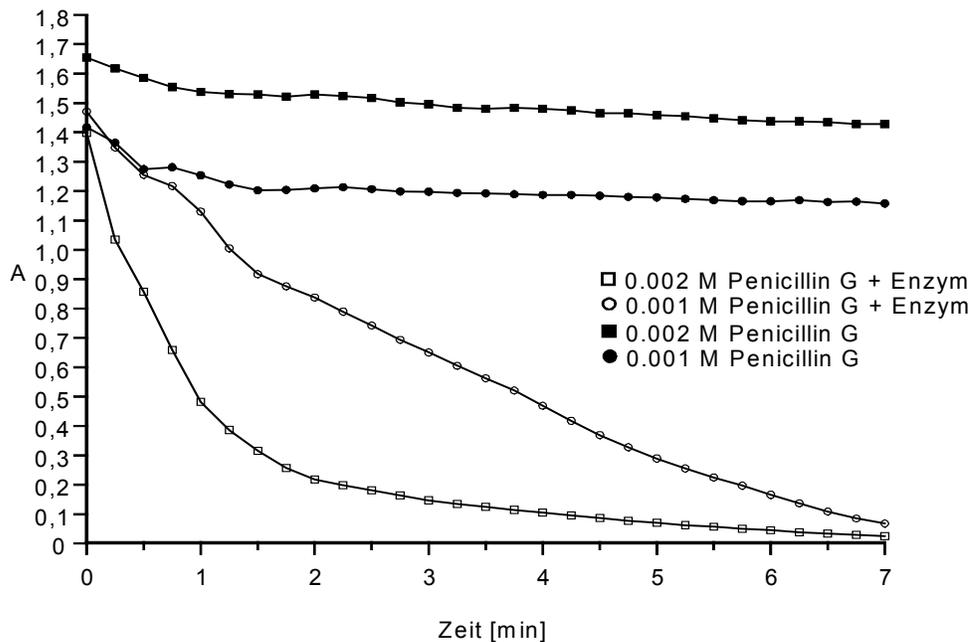


Abb. 7-2 Kinetische Messungen mit dem Enzym  $\beta$ -Lactamase bei 0.002M und 0.001M Penicillin G Konzentration der Substratlösungen. Die Verdünnung durch die Zugabe von 5 $\mu$ L Enzymlösung zu 200 $\mu$ L Substratlösung wurde vernachlässigt.

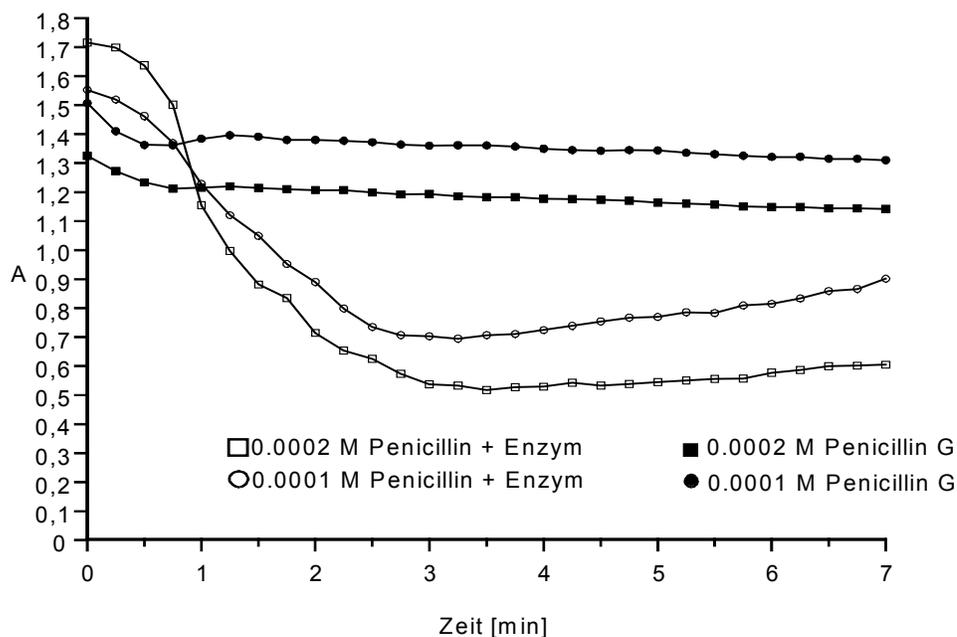


Abb. 7-3 Kinetische Messungen mit dem Enzym  $\beta$ -Lactamase bei 0.0002M und 0.0001M Penicillin G Konzentrationen der Substratlösungen. Die Verdünnung durch die Zugabe von 5 $\mu$ L Enzymlösung zu 200 $\mu$ L Substratlösung wurde vernachlässigt.

### 7.2.1. Diskussion der Ergebnisse

Das Enzym  $\beta$ -Lactamase katalysiert die Spaltung von Penicillin G zu Penicillinsäure (vgl. Kapitel 6). Dabei entsteht eine Säuregruppe, und die Reaktion kann durch eine pH-Elektrode oder einen pH-sensitiven Farbstoff detektiert werden. Als Farbstoff wurde das in Kapitel 4.2.8 vorgestellte HPTS verwendet. Dieser Farbstoff hat sein Maximum der Absorption bei alkalischen pH-Werten und entfärbt sich im sauren pH-Bereich. Ein linearer Zusammenhang wird für pH-Werte zwischen pH 6.4-8.2 gefunden, vgl. Kapitel 4.2.8. Betrachtet man nun die erhaltenen Kurven für verschiedene Penicillin G Konzentrationen sieht man, daß die schnellste Entfärbung bei einer Konzentration von 0.02M Penicillin G erfolgt. Geht man dann zu niedrigeren Konzentrationen über, so dauert es bei einer 0.001M Penicillin G Lösung über 7 Minuten bis die Entfärbung vollständig ist. Noch niedrigere Konzentrationen führen zu weiteren Effekten. Betrachtet man die Konzentrationen 0.0002M und 0.0001M Penicillin G, so sieht man, daß es durch die Zugabe der Enzymlösung zu einer Erhöhung des pH-Wertes kommt, da die Absorption der Substratlösung niedriger liegt, als die Absorption der Substratlösung mit Enzym. Dies hat seinen Grund darin, daß die Enzymlösung in Carbonatpuffer angesetzt wurde und durch die Zugabe der Anteil an Carbonat in der Substratlösung erhöht worden ist. Desweiteren ist bei diesen Kurven zu sehen, daß die Konzentration an Penicillin G nicht mehr ausreicht, um

die Pufferwirkung des HPTS auszugleichen, deswegen kommt es nach einem Abfall der Kurven zu einem Wiederanstieg der Absorption nach 3-4 Minuten.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß eine Konzentration von 0.02M Penicillin G die besten Ergebnisse geliefert hat. Zum einen ist die Entfärbung der Substratlösung sehr schnell, zum anderen ist die Absorption der Substratlösung ohne Enzym wesentlich konstanter als bei niedrigeren Konzentrationen.

Als Ergebnis dieser Vorversuche wurde eine Konzentration von 0.02M Penicillin G gewählt, da hier eine eindeutige Korrelation zwischen der Abnahme der Absorption (pH-Änderung) und der eingesetzten Enzym-Konzentration vorliegt, sowie kurze Zeiträume für die Messung gewählt werden können.

### 7.3 Tracersynthesen

In der vorliegenden Arbeit wurden Tracer mit drei verschiedenen Haptenen hergestellt. In Abbildung 7-4 sind die Strukturen der zur Kopplung verwendeten Haptene dargestellt. Diese Haptene wurden von Dr. H. Holthues zur Verfügung gestellt.

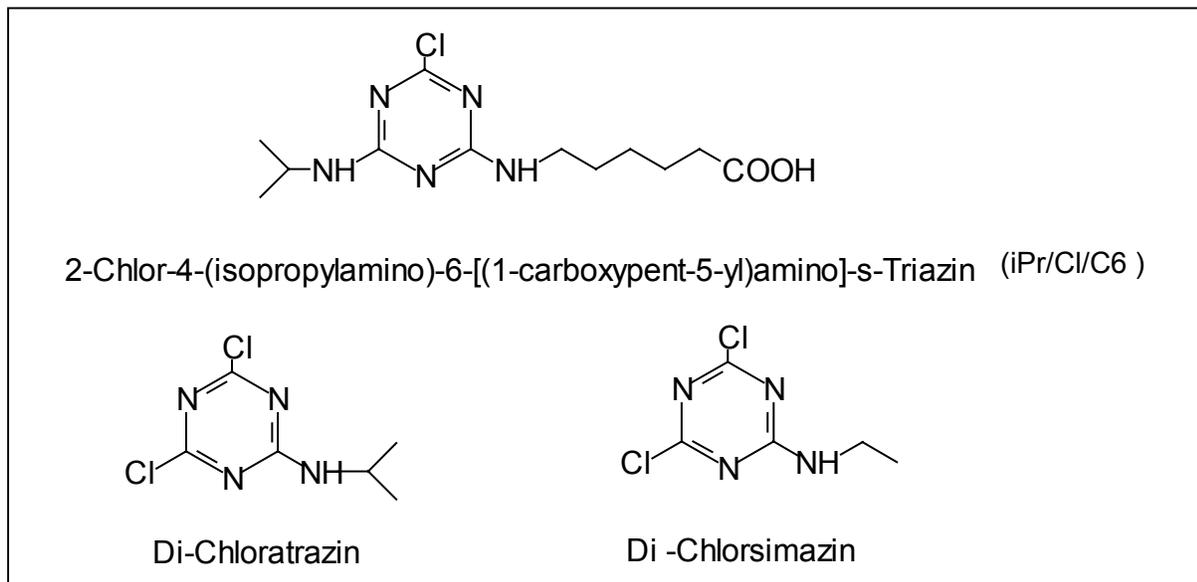


Abb. 7-4 Struktur der zur Tracersynthese verwendeten Haptene

#### 7.3.1. Synthese des iPr/Cl/C6-Tracers:

Der erste Tracer war ein Derivat aus  $\beta$ -Lactamase und dem Hapten iPr/Cl/C6. Er wurde folgendermaßen hergestellt:

Die Carboxylgruppen des Haptenderivates wurden kovalent mit den freien Aminogruppen der Lysin-Reste des Enzyms mittels der Carbodiimidmethode verbunden [47,133]. Abbildung 7-5 zeigt die Reaktion schematisch.

Vorschrift :

1mg Haptenderivat, 1.7mg N-Hydroxysuccinimid und 6.2mg Dicyclohexylcarbodiimid werden in 130 $\mu$ L Dioxan gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 18h bei Raumtemperatur wird von dem ausgefallenen Ureat abzentrifugiert. Der Überstand wird langsam zu einer Lösung von 2mg  $\beta$ -Lactamase in 2mL 0.13mol/L NaHCO<sub>3</sub> gegeben. Nach 3h Inkubation erfolgt die Abtrennung der nicht gebundenen Derivate durch Dialyse. Die Dialyse erfolgt gegen PBS-Puffer für drei Tage. Der PBS-Puffer wird zweimal pro Tag gewechselt. Das Volumen des PBS-Puffers beträgt 250mL. Der Tracer wurde in Aliquots zu 250 $\mu$ L in Eppendorfgefäßen bei 4°C aufbewahrt.

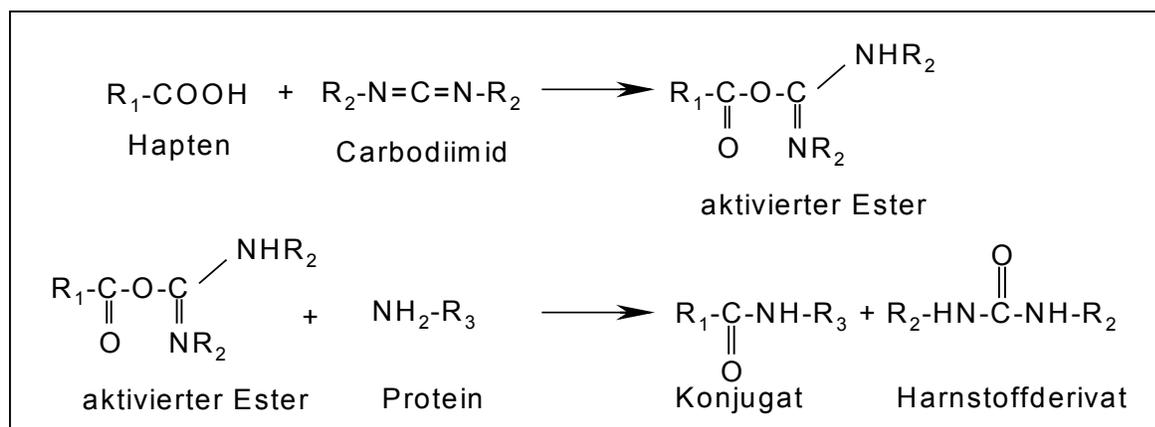


Abb. 7-5 Schematische Darstellung der Carbodiimidmethode  
(R<sub>1</sub> = Triazinring; R<sub>2</sub> = Cyclohexylrest; R<sub>3</sub> = Enzymrest)

Die Einsetzbarkeit des Tracers wurde in einem kompetitiven Immunoassay ausgetestet. Ziel war die Bestimmung der Absorptionsunterschiede der sogenannten Überschußprobe (1000µg/L an Atrazin) und der Nullprobe (0µg/L an Atrazin). Die Überschußprobe symbolisiert die minimalste Tracerbindung und die Nullprobe die maximal mögliche Tracerbindung. Der Immunoassay für den iPr/Cl/C6-Tracer wurde folgendermaßen durchgeführt:

#### ELISA-Protokoll:

1. Vorcoaten: mit Ziege-anti-Maus Antikörper, Verdünnung 1:700 in Carbonatpuffer, 200 µL pro Kavität, über Nacht bei 4° C
2. Waschen : 3 x mit PBST
3. Coaten : mit K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> monoklonalem Antikörper, Verdünnung 1:50000 in PBS-Puffer, 200µL pro Kavität, 2.5h bei Raumtemperatur
4. Waschen : 3 x mit PBST
5. Immunreaktion : 100 µL Tracerverdünnung + 100 µL PBS bzw. 100 µL Atrazin-Standard (c = 1000µg/L)
6. Waschen : 3 x mit PBS; 1 x mit H<sub>2</sub>O
7. Substratzugabe : 200 µL Substratlösung 1, Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur
8. Messen: Zugabe von 50 µL Chromogen-Lösung, Messung bei 450 nm mit dem EIA-Reader

In Abbildung 7-6 sind die Ergebnisse dargestellt.

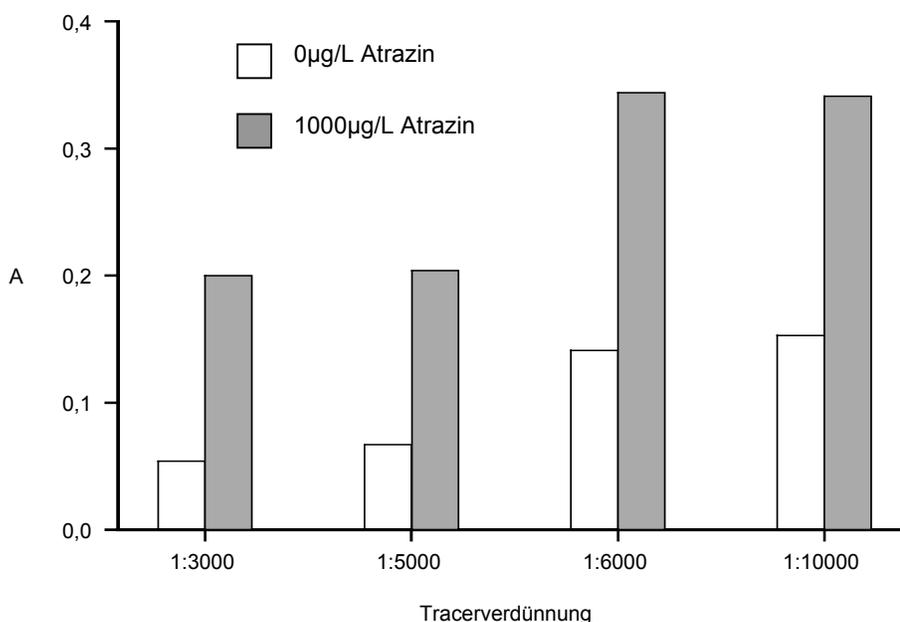


Abb. 7-6 Darstellung der Ergebnisse für eine  $K_4E_7$  Verdünnung von 1:50000 und verschiedene Tracerverdünnungen des iPr/Cl/C6-Tracers.

Dieser Tracer wurde zur Optimierung des Immunoassay-Protokolls verwendet. (Vgl. Kap. Optimierung des Ablaufs des Immunoassays mit dem iPr/Cl/C6-Tracer.)

Aufgrund der begrenzten Haltbarkeit von Biomolekülen mußte dieser Tracer noch ein zweites Mal hergestellt werden. Es wurde dieselbe Kopplungsvorschrift verwendet, aber die Dialyse erfolgt gegen PB-Puffer, da in der Literatur von einer Hemmung der Lactamase durch Chlorid-Ionen berichtet wurde [165]. Der Ziege-anti-Maus Antikörper wurde von Sigma geliefert. In der nun verwendeten Charge war mehr Antikörper enthalten, deswegen wurde auf die vorherige Konzentration zurückgerechnet und die jetzt eingesetzte Verdünnung betrug 1:850. Es wurden verschiedene  $K_4E_7$ -Antikörper Verdünnungen eingesetzt, um eine Abschätzung zu erhalten, ob auch bei höheren Verdünnungen noch ein ausreichender Unterschied zwischen der Absorption der Überschuß- und Nullprobe erhalten werden kann. Eine höhere Verdünnung des Antikörpers  $K_4E_7$  hat einmal den Vorteil, daß mit besseren Testmittelpunkten zu rechnen ist, desweiteren ist der Verbrauch an Antikörper geringer.

## ELISA-Protokoll:

1. Vorcoaten: mit Ziege-anti-Maus Antikörper, Verdünnung 1:850 in Carbonatpuffer, 200  $\mu$ L pro Kavität, über Nacht 4° C
2. Waschen : 3 x mit PBST
3. Coaten : mit K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> monoklonalem Antikörper, Verdünnung 1:25000; 1:50000; 1:75000; 1:100000 in PBS-Puffer; 200 $\mu$ L pro Kavität, 2.5h Raumtemperatur
4. Waschen : 3 x mit PBST
5. Immunreaktion : 100  $\mu$ L Tracerverdünnung + 100  $\mu$ L PBS bzw. 100  $\mu$ L Atrazin-Standard (c = 1000 $\mu$ g/L)
6. Waschen : 3 x mit PBST; 1 x mit H<sub>2</sub>O
7. Substratzugabe : 200  $\mu$ L Substratlösung 2, Inkubation über Nacht
8. Messen: Zugabe von 50  $\mu$ L Chromogen-Lösung, Messung bei 450 nm mit dem EIA-Reader

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 7-7 und 7-8 dargestellt.

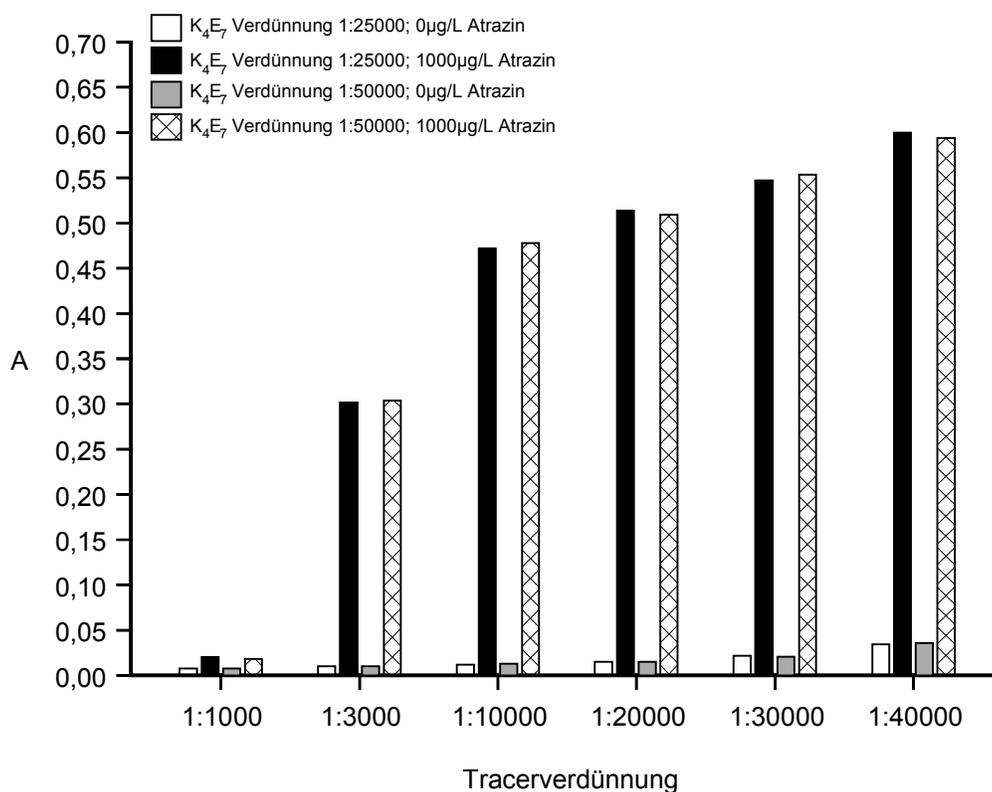


Abb. 7-7 Darstellung der Ergebnisse für die K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> Verdünnungen 1:25000 und 1:50000 und verschiedenen Tracerverdünnungen des iPr/Cl/C6-Tracers.

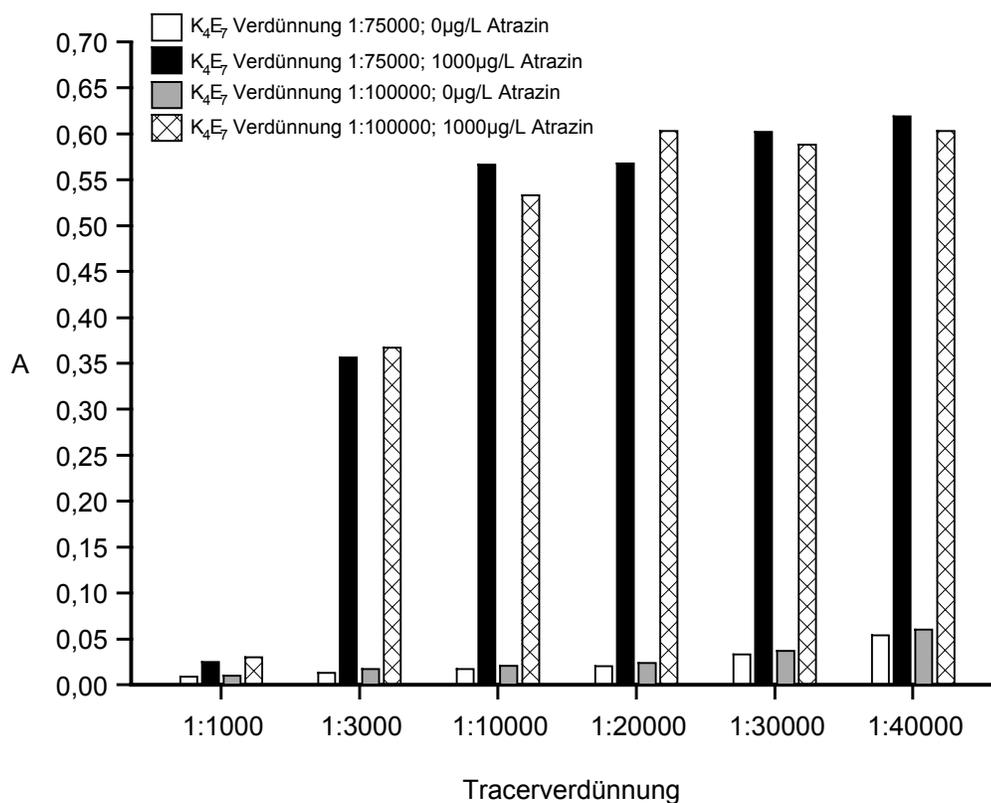


Abb. 7-8 Darstellung der Ergebnisse für die K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> Verdünnungen 1:75000 und 1:100000 und verschiedenen Tracerverdünnungen des iPr/Cl/C6-Tracers.

### 7.3.2. Darstellung der Di-Chlorsimazin- und Dichloratrazin-Tracer

Die Kopplung der Di-Chlorderivate erfolgt über die nukleophile Substitution eines Chlor-Atoms durch die Aminogruppen der Lysin-Reste im Enzym [177].

#### Vorschrift:

100µg Hapten werden in 20µL Ethanol gelöst. 0.1mg reines Enzym wird in 0.25mL Carbonatpuffer gelöst, und die Haptenlösung wird zugegeben. Die Mischung inkubiert über Nacht bei Raumtemperatur. Ungebundenes Hapten wird durch Dialyse gegen PBS-Puffer entfernt [177].

Die Einsetzbarkeit der Tracer wurde in einem kompetitiven Immunoassay ausgetestet. Ziel war die Bestimmung der Absorptionsunterschiede der Überschußprobe (1000µg/L an Atrazin) und

der Nullprobe ( $0\mu\text{g/L}$  an Atrazin). Der Immunoassay für den Di-Chloratrazin-Tracer wurde folgendermaßen durchgeführt:

ELISA-Protokoll:

1. Vorcoaten: mit Ziege-anti-Maus Antikörper, Verdünnung 1:700 in Carbonatpuffer,  $200\ \mu\text{L}$  pro Kavität, über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$
2. Waschen : 3 x mit PBST
3. Coaten : mit  $\text{K}_4\text{E}_7$  monoklonalem Antikörper, Verdünnung 1:50000 in PBS-Puffer,  $200\mu\text{L}$  pro Kavität, 2.5h bei Raumtemperatur
4. Waschen : 3 x mit PBST  
1 x mit PBS
5. Immunreaktion :  $100\ \mu\text{L}$  Tracerverdünnung +  $100\mu\text{l}$  PBS oder  $100\mu\text{l}$  Atrazin-Standard ( $c = 1000\mu\text{g/L}$ ), 1.5h bei Raumtemperatur
6. Waschen : 3 x mit PBST; 1 x mit  $\text{H}_2\text{O}$
7. Substratzugabe :  $200\ \mu\text{L}$  Substratlösung 1, Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur
8. Messen: Zugabe von  $50\ \mu\text{L}$  HPTS-Lösung, Messen bei  $450\ \text{nm}$  mit dem EIA-Reader

In Abbildung 7-9 sind die Ergebnisse dargestellt.

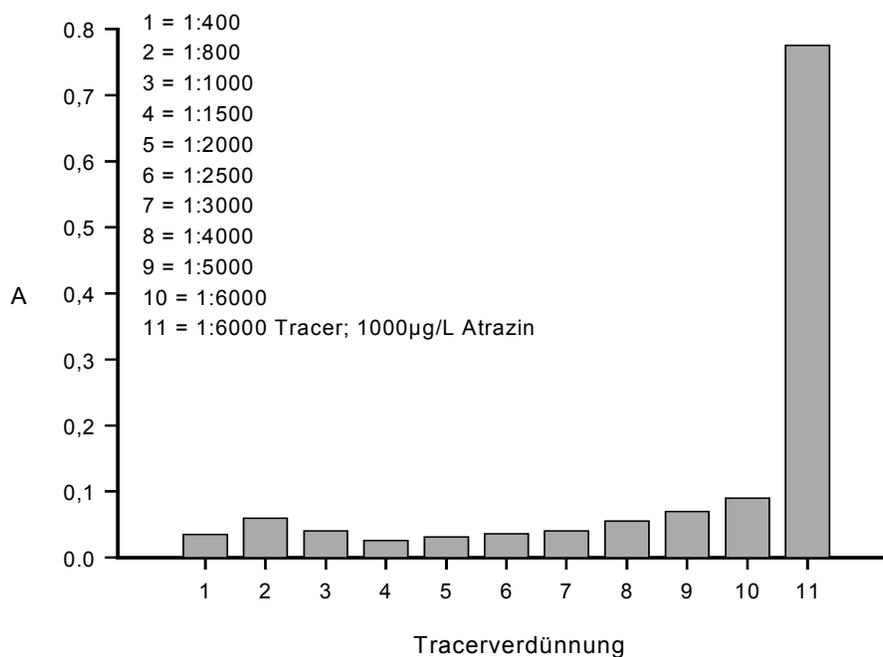


Abb. 7-9 Darstellung der Ergebnisse für eine  $\text{K}_4\text{E}_7$  Verdünnung von 1:50000 und verschiedene Tracerverdünnungen des Di-Chloratrazin-Tracers. Die Tracerverdünnungen 1-10 wurden mit  $0\mu\text{g/L}$  Atrazin angesetzt.

Der Immunoassay für den Di-Chlorsimazin-Tracer wurde folgendermaßen durchgeführt:

ELISA-Protokoll:

1. Vorcoaten: mit Ziege-anti-Maus Antikörper, Verdünnung 1:700 in Carbonatpuffer, 200  $\mu$ L pro Kavität, über Nacht bei 4° C
2. Waschen : 3 x mit PBST
3. Coaten : mit K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> monoklonalem Antikörper, Verdünnung 1:50000 in PBS-Puffer, 200 $\mu$ L pro Kavität, 2.5h bei Raumtemperatur
4. Waschen : 3 x mit PBST, 1 x mit PBS
5. Immunreaktion : 100  $\mu$ L Tracerverdünnung + 100 $\mu$ L PBS oder 100 $\mu$ L Atrazinstandard (c = 1000 $\mu$ g/L), 1.5h bei Raumtemperatur
6. Waschen : 3 x mit PBST; 1 x mit H<sub>2</sub>O
7. Substratzugabe : 200  $\mu$ L Substratlösung 1 in Wasser, Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur
8. Messen: Zugabe von 50  $\mu$ L HPTS-Lösung, Messen bei 450 nm mit dem EIA-Reader

In Abbildung 7-10 sind die Ergebnisse dargestellt.

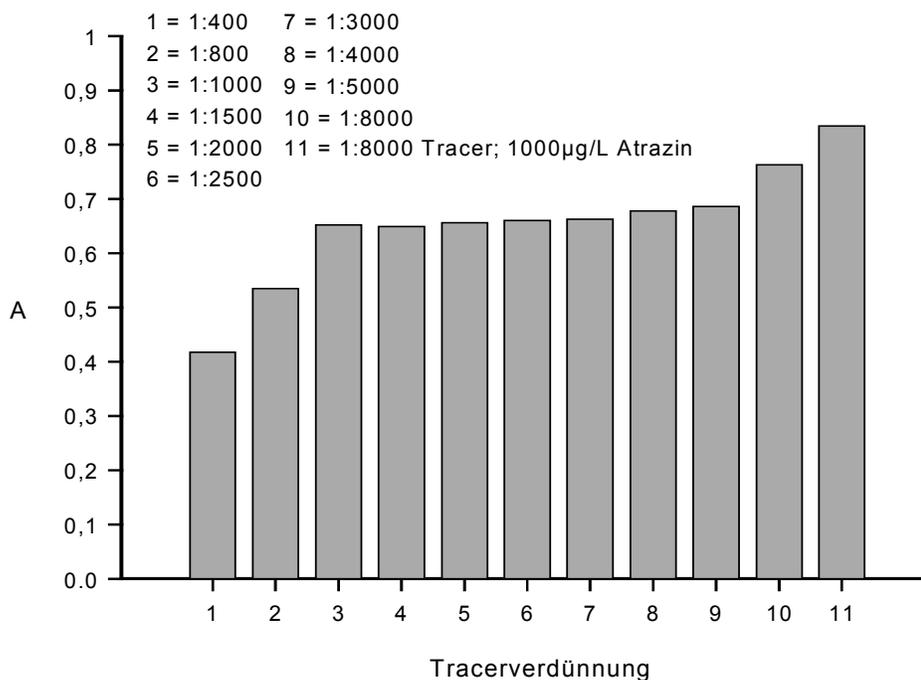
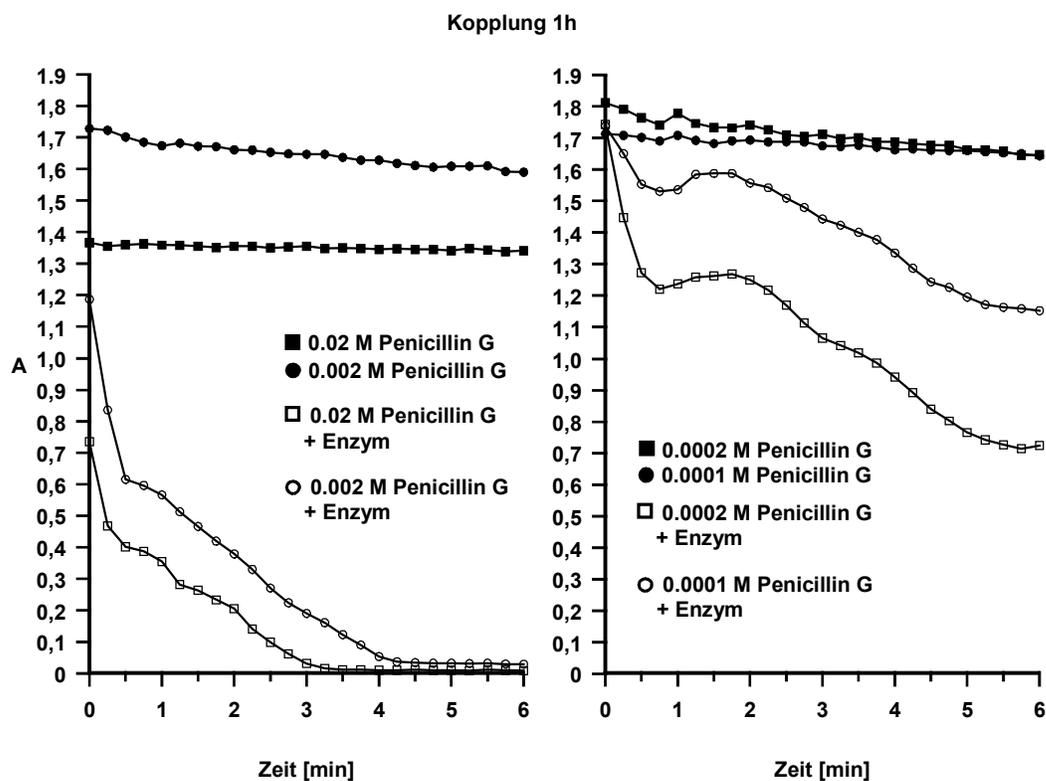
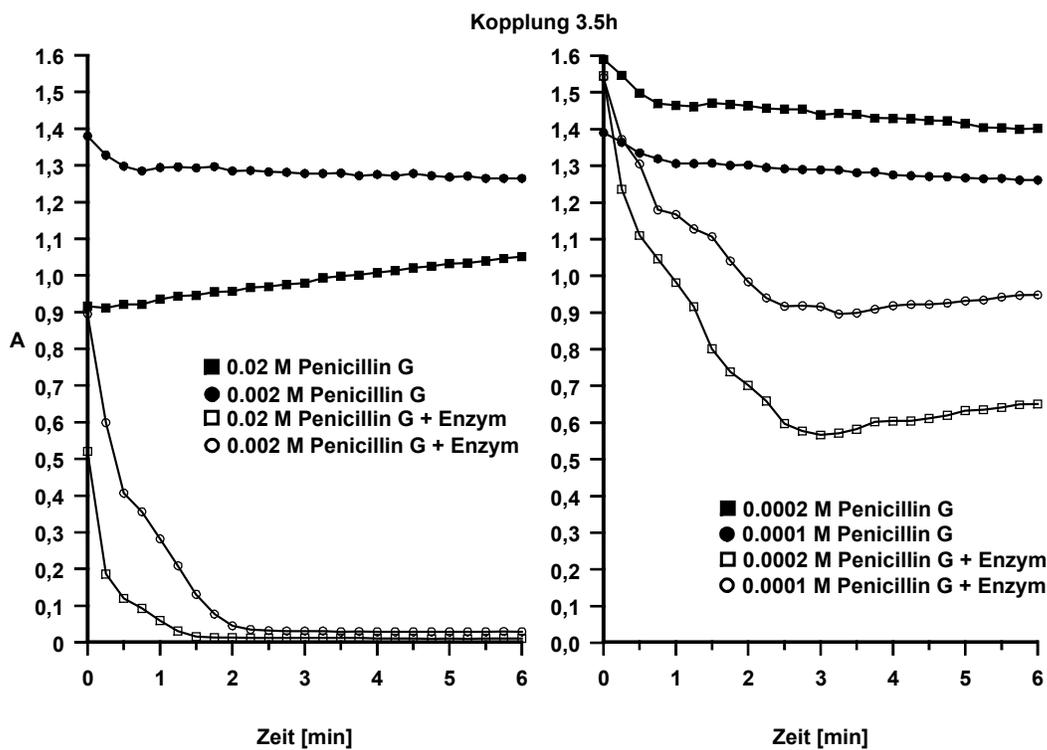
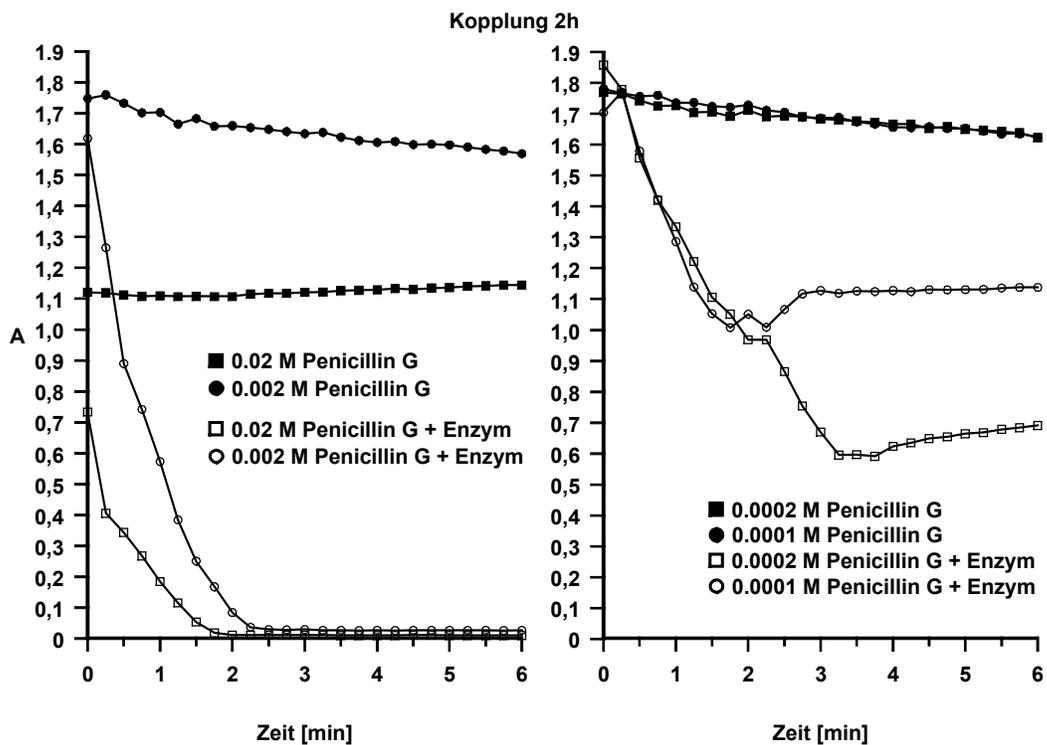


Abb. 7-10 Darstellung der Ergebnisse für eine K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> Verdünnung von 1:50000 und verschiedene Tracerverdünnungen des Di-Chlorsimazin-Tracers. Die Tracerverdünnungen 1-10 wurden mit 0 $\mu$ g/L Atrazin angesetzt.

### 7.3.3 Untersuchungen zum Einfluß der Kopplung auf die Kinetik der Enzymreaktion

Die Kopplung der Haptene an das Enzym kann einen Einfluß auf die dreidimensionale Struktur haben, da durch die Verbindung des Haptens mit den Lysinresten eventuell Wasserstoffbrückenbindungen, welche die Struktur stabilisiert haben, unterbrochen werden können und es damit zu einer Strukturänderung kommen kann. Diese Strukturänderung hat im ungünstigsten Fall eine Inaktivierung des Enzyms zur Folge. Gerade bei der  $\beta$ -Lactamase ist eine solche Untersuchung wichtig, da eine Stabilisierung der Struktur bei diesem Enzym über Sulfid-Brücken nicht gegeben ist, sondern ausschließlich über Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt. Um den Einfluß der Kopplung zu untersuchen, wurden, in Anlehnung an die kinetischen Untersuchungen des unmodifizierten Enzyms, während der Kopplung 20  $\mu$ L der Lösung aus dem Ansatz entfernt, mit 40  $\mu$ L dest. Wasser verdünnt und mit verschiedenen Konzentrationen an Penicillin G mittels des EIA-Readers im Kinetik Modus vermessen. Die folgenden Abbildungen zeigen die Untersuchungen nach den Kopplungszeiten 1h, 2h, 3.5h und über Nacht.





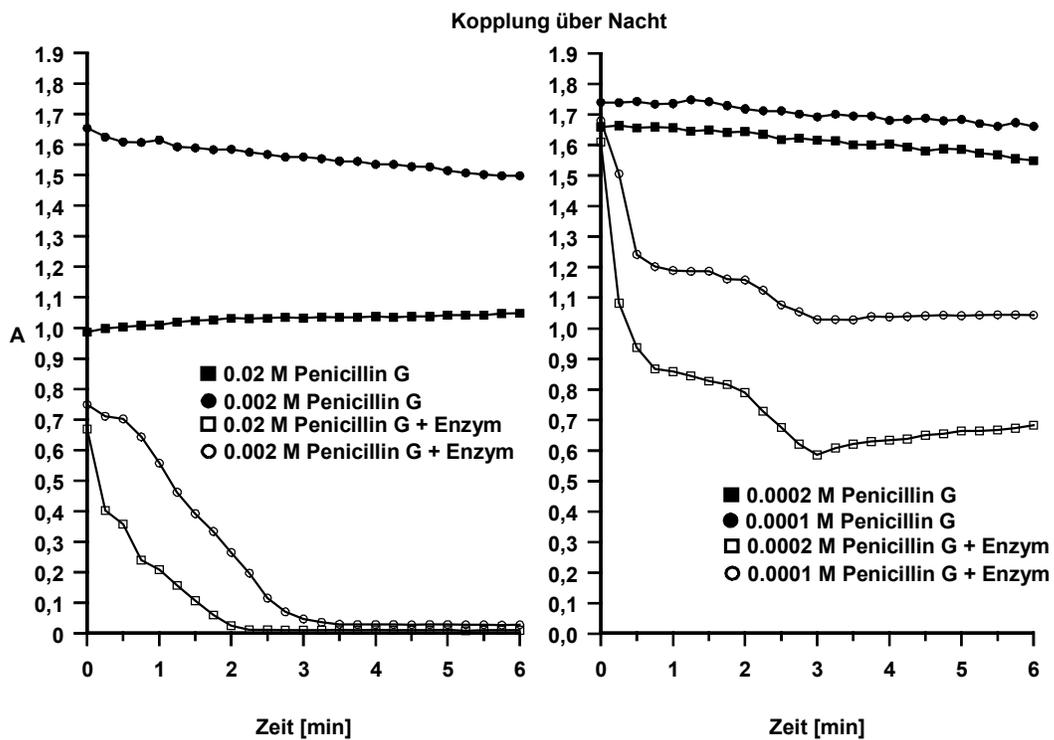


Abb. 7-11 Kinetische Untersuchung des Einflusses der Kopplung des Di-Chlorsimazins auf die Enzymkinetik nach unterschiedlichen Kopplungszeiten.

### 7.3.4 Zusammenfassung und Diskussion

#### Tracersynthese:

Alle hergestellten Tracer waren in der Lage, in einem kompetitiven Immunoassay eingesetzt zu werden. Es wurden hier nur Nullprobe und Überschußprobe getestet, um festzustellen, ob der dargestellte Tracer in der Lage ist, mit dem Analyten um die freien Bindungstellen des Antikörpers zu konkurrieren. Die einsetzbaren Verdünnungen sind unterschiedlich. Dies hängt zum einen von der Kopplungsdichte und zum anderen von der Affinität des eingesetzten Haptens zum Antikörper ab. Hat das eingesetzte Hapten eine geringe Affinität zum Antikörper, kann der Analyt besser um die Antigenbindungsstellen des Antikörpers konkurrieren. Genauso kann bei einer hohen Kopplungsdichte der Analyt schlechter um die Bindungsstellen konkurrieren.

Die dargestellten Tracer wurden in einem kompetitiven Immunoassay eingesetzt, um Aspekte wie den Einfluß der verschiedenen Tracer auf den Testmittelpunkt, Reproduzierbarkeit des Immunoassays und Sensitivität zu testen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

#### Enzymkinetik:

Betrachtet man die unterschiedlichen Kopplungszeiten, dann kann man sehen, daß mit fortschreitender Zeit die erhaltenen Kurven einen stabileren Verlauf erhalten. Während die Kurve nach einer Stunde bei den niedrigeren Konzentrationen einen instabilen Verlauf nimmt, werden nach der Kopplung über Nacht fast die Werte erreicht, die für das unmodifizierte Enzym erreicht werden. In der Literatur ist über eine Stabilisierung der Lactamase nach der Kopplung berichtet worden [166]. Diese Untersuchungen könnten einen ersten Hinweis auf eine solche Stabilisierung sein.

## 7.4 Der Immunoassays unter Verwendung des iPr/Cl/C6-Tracer

### 7.4.1 Optimierung des Ablaufs des Immunoassays mit dem iPr/Cl/C6-Tracer

Zuerst wurden verschiedenen Kalibrierkurven aufgenommen, um die Einsetzbarkeit des Tracers im Immunoassay zu testen. Als Verdünnungen wurde aufgrund der zuvor durchgeführten Tracer-Validierung eine 1:3000 und 1:5000 Verdünnung ausgewählt, da bei dieser Verdünnung die Nullprobe den kleinsten Absorptionswert zeigte. Der Unterschied zwischen Nullprobe und Überschußprobe sollte genügend groß sein, damit die Unterschiede zwischen den Absorptionswerten der verschiedenen Atrazinkonzentrationen signifikant sind. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Immunoassays ist bei der Verwendung der Lactamase zu beachten, daß die Nullprobe zwar die größte Menge an gebundenem Tracer darstellt, aber nicht die höchste Absorption liefert, da das Chromogen HPTS durch eine hohe Konzentration an  $H^+$ -Ionen entfärbt wird. Die erhaltenen Kalibrierkurven laufen damit von niedrigen Absorptionswerten zu hohen Absorptionswerten.

Der kompetitive Immunoassay wurde folgendermaßen durchgeführt:

ELISA Protokoll:

1. Vorcoaten: Ziege-anti-Maus Antikörper, Verdünnung 1:700 in Carbonatpuffer, 200µL pro Kavität, über Nacht bei 4° C
2. Waschen: 3xPBST
3. Coaten: K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> monoklonaler Antikörper, Verdünnung 1:50000 in PBS, 200µL pro Kavität, 3h bei Raumtemperatur
4. Waschen: 3xPBST, 1xPBS
5. Konkurrenz: 100 µL Tracer + 100µl PBS oder 100µL Atrazinstandards, 2h bei Raumtemperatur
6. Waschen: 3xPBS, 1xH<sub>2</sub>O
7. Substratumsatz: Substratlösung 1, über Nacht bei Raumtemperatur
8. Messen: Zugabe von 50 µl Chromogenlösung, Messung bei 450 nm im EIA-Reader

Tabelle 7-1 stellt die erhaltenen Ergebnisse dar:

Tracerverdünnung	$I_{50}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	20% B/B <sub>0</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	80% B/B <sub>0</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	Korrelation
1:3000	9.341	2.917	30.827	0.999
	7.986	1.679	26.863	0.999
	9.564	3.766	31.914	0.997
	9.821	2.187	33.354	0.995
	9.178 ± 0.819 (VK 8.92%)	2.637 ± 0.907 (VK 34.43%)	30.740 ± 2.784 (VK 9.06%)	
1:5000	5.271	0.772	17.337	0.991
	5.143	0.808	23.804	0.997
	6.002	1.743	24.422	0.999
	4.032	0.789	10.904	0.987
	5.112 ± 0.813 (VK 15.91%)	1.028 ± 0.477 (VK 46.39%)	19.117 ± 6.344 (VK 33.18%)	

Tab. 7-1 Ergebnisse des Immunoassays mit dem iPr/Cl/C6-Tracer. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Messungen pro Tracerverdünnung.

Um eine Verbesserung des Testmittelpunktes zu erreichen, wurde die Tracerkonzentration herabgesetzt. Weiterhin wurde ausgetestet, wie sich verschiedene Waschschriffe zwischen dem Wettbewerbsschritt und der Substratreaktion des ELISA's auf den Testmittelpunkt auswirken. Für die nachfolgenden Experimente wurden Tracerverdünnungen von 1:6000 und 1:10000 ausgewählt. Das ELISA Protokoll war das gleiche wie für die vorausgegangenen Versuche mit dem Unterschied, daß die Waschschriffe zwischen Wettbewerb und Substratreaktion variiert worden sind.

In den folgenden Tabellen 7-2 und 7-3 werden die Ergebnisse dargestellt:

Waschschriffe	$I_{50}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	20%B/B <sub>0</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	80%B/B <sub>0</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	Korrelation	$A_{\bar{u}}-A_0$
3xPBS; 1xH <sub>2</sub> O	2.741	0.841	9.610	0.994	0.198
1xPBST; 2xPBS, 1xH <sub>2</sub> O	3.208	0.615	18.623	0.996	0.203
3xPBS; 1xH <sub>2</sub> O	7.799	2.220	40,647	0.989	0.124
2xPBST; 1xPBS, 1xH <sub>2</sub> O	5.662	1.968	23.676	0.988	0.182
3xPBS; 1xH <sub>2</sub> O	7.312	2.406	23.857	0.999	0.234
3xPBST; 1xPBS, 1xH <sub>2</sub> O	14.853	4.506	49.912	0.999	0.267

Tab. 7-2 Einfluß der Waschschriffe zwischen Wettbewerb- und Substrat-Reaktion bei einer Tracer Verdünnung von 1:6000 des iPr/Cl/C6-Tracers.

Waschschritte	$I_{50}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	20%B/ $B_0$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	80%B/ $B_0$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	Korrelation	$A_U - A_0$
3xPBS; 1xH <sub>2</sub> O	1.952	0.515	6.797	0.994	0.168
1xPBST; 2xPBS, 1xH <sub>2</sub> O	2.940	0.623	13.399	0.996	0.177
3xPBS; 1xH <sub>2</sub> O	1.088	0.374	5,223	0.970	0.097
2xPBST; 1xPBS, 1xH <sub>2</sub> O	5.972	1.158	33.446	0.992	0.161
3xPBS; 1xH <sub>2</sub> O	3.588	1.025	13.680	0.998	0.229
3xPBST; 1xPBS, 1xH <sub>2</sub> O	7.236	2.023	25.970	0.999	0.265

Tab. 7-3 Einfluß der Waschschritte zwischen Konkurrenz- und Substrat-Reaktion bei einer Tracer Verdünnung von 1:10000 des iPr/Cl/C6-Tracers.

Die erreichten Testmittelpunkte waren noch nicht zufriedenstellend. Bei der Antigen-Antikörperreaktion handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion. Diese Gleichgewichtsreaktion ist zeitabhängig. Man kann durch eine Verkürzung der Inkubationszeit den Nachteil des Analyten gegenüber dem höher affinen Tracer etwas kompensieren. Man muß aber bei diesem Schritt immer im Auge behalten, daß eine Zeitverkürzung auch einen Einfluß auf den Unterschied in der Absorption der Überschuß- und der Nullprobe haben kann, deswegen wurde die Inkubationszeit des Konkurrenzschrittes versuchsweise auf 1.5h verkürzt. Als sich keine negativen Einflüsse auf den Unterschied in der Absorption der Überschuß- und Nullprobe ergaben wurde für alle folgenden Immunoassays der Konkurrenzschritt auf 1.5h festgelegt.

Außer einem guten Testmittelpunkt sollte der Immunoassay auch einen ausreichenden Unterschied in der Absorption zwischen Nullprobe und Überschußprobe aufweisen. Ein letzter Waschschritt mit Wasser ist wichtig, da durch einen in der Kavität vorhandenen Rest an Waschpuffer die entstehenden H<sup>+</sup>-Ionen abgepuffert werden und damit die Änderung des pH-Wertes verlangsamt werden kann. Das in den einzelnen Kavitäten zurückgelassene Volumen an Waschpuffer oder PBS kann unterschiedlich sein und damit zu einer Verschlechterung der Korrelation des Assays beitragen.

Tabelle 7-4 zeigt die Ergebnisse für diese Untersuchung.

Waschschritte	$I_{50}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	20%B/ $B_0$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	80%B/ $B_0$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	Korrelation	$A_U - A_0$
3xPBST, 1xH <sub>2</sub> O	1.703	0.430	7.424	0.998	0.393
3xPBST, 1xH <sub>2</sub> O	1.641	0.528	7.150	0.997	0.416
3xPBST, 1xPBS	1.170	0.207	9.128	0.996	0.223
3xPBST, 1xPBS	1.082	0.220	4.033	0.997	0.267

Tab. 7-4 Einfluß der Waschschritte zwischen Konkurrenz- und Substrat-Reaktion bei einer Tracer Verdünnung von 1:10000 des iPr/Cl/C6-Tracers.

Abbildung 7-12 zeigt eine exemplarische Kalibrierkurve, die erhalten wurde mit dem iPr/Cl/C6-Tracer in einer Verdünnung von 1:10000 und einer  $K_4E_7$ -Verdünnung von 1:50000

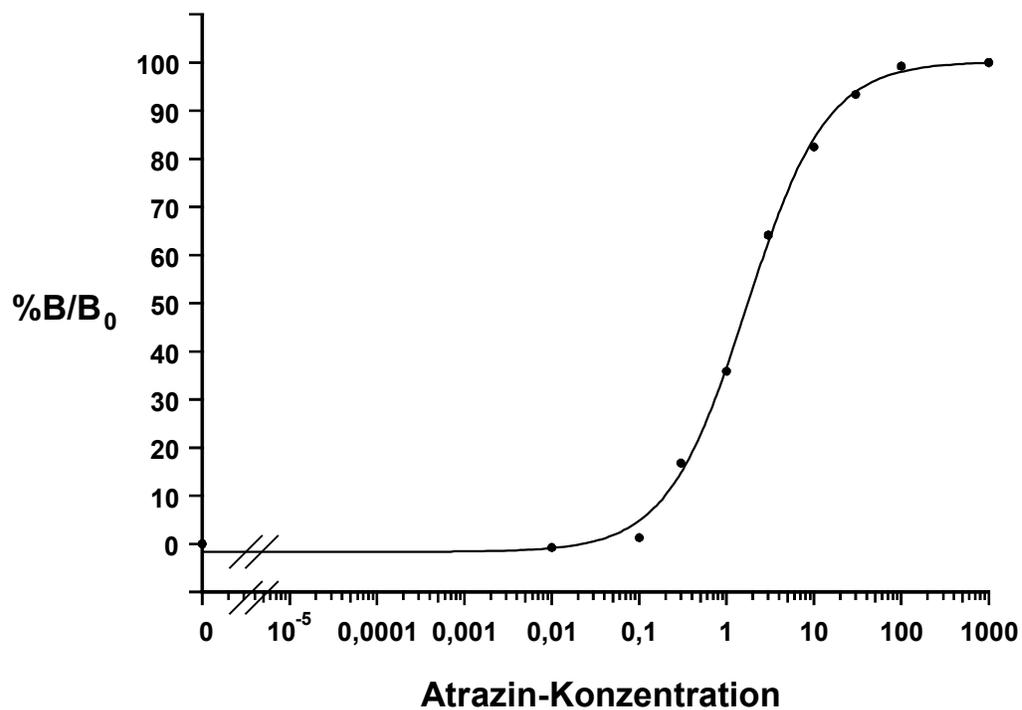


Abb. 7-12 Exemplarische Kalibrierkurve, erhalten mit dem iPr/Cl/C6-Tracer. Tracer-Verdünnung 1:10000,  $K_4E_7$ -Verdünnung 1:50000.

#### 7.4.2 Zusammenfassung und Diskussion

Der eingesetzte iPr/Cl/C6-Tracer konnte erfolgreich in einem kompetitiven Immunoassay verwendet werden. Die untersuchten Tracer-Verdünnungen waren in der Lage, eine Bindung des Analyten, in Abhängigkeit von seiner Konzentration, an den Antikörper zu verhindern. Die zuerst erreichten Testmittelpunkte waren nicht zufriedenstellend. Außerdem waren die erreichten Unterschiede  $A_0 - A_0$  zwischen der Absorption der Überschuß- und Nullprobe noch nicht ausreichend. Es wurden Untersuchungen durchgeführt, ob unterschiedliche Waschschritte einen Einfluß auf den Testmittelpunkt haben. Zuerst wurde auf ein Waschen mit PBST verzichtet, da aufgrund der Eigenschaften der  $\beta$ -Lactamase nicht eingeschätzt werden konnte, ob durch einen Einsatz von Detergenzien die Struktur beeinflußt werden würde. Es konnte festgestellt werden, daß in Abhängigkeit der Anzahl der Waschschritte mit PBST, es zu einer Verschlechterung des Testmittelpunktes kam, aber der Unterschied in den Absorptionswerten der Null- und Überschußprobe zunahm. Es konnte durch eine Verkürzung der Zeit des Competitionsschrittes eine Verbesserung der Testmittelpunkte erreicht werden. Der Immunoassay mit PBS als letztem Waschschritt ergab einen etwas besseren Testmittelpunkt, aber der Unterschied in der Absorption zwischen der Überschußprobe und der Nullprobe war geringer. Um eine bessere Sensitivität zu erreichen, ist ein größerer Unterschied zwischen  $A_0$  und  $A_0$  von Vorteil, da auch geringe Änderungen in der Absorption einen signifikanten Unterschied in der Konzentration bewirken. Deswegen wurde dem Waschen mit Wasser der Vorzug gegeben. Die erreichten Testmittelpunkte reichen noch nicht aus, um die von der Europäischen Union erforderlichen Grenzwerte von 0.1  $\mu\text{g/L}$  für ein einzelnes Pestizid zu erreichen. Um eine weitere Verbesserung zu bewirken, werden andere Tracer eingesetzt, die eine geringere Affinität zum Antikörper besitzen. Das eingesetzte iPr/Cl/C6 Derivat ist zwar mit dem für die Immunogensynthese eingesetzten Hapten nicht identisch, aber es weist die höchste Affinität zum Antikörper auf. Diese Ergebnisse wurden auch schon von anderen Arbeitsgruppen gefunden. Erschwerend kommt hinzu, daß durch die hohe Anzahl an Lysin-Resten im Enzym eine hohe Kopplungsdichte zu erwarten ist. Durch die hohe Kopplungsdichte ist die Anzahl an gekoppelten Haptenen groß, und damit hat der Antikörper viele Möglichkeiten, den Tracer zu binden, und der Analyt wird zurückgedrängt. Durch den Einsatz eines Tracer mit geringerer Affinität zum Antikörper könnte dieser Nachteil etwas zurückgedrängt werden, und eine Verbesserung des Testmittelpunktes erreicht werden. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Immunoassays unter Verwendung der Dichlorderivate dargestellt.

---

Der vorläufige optimierte Ablauf des Immunoassays ist der folgende:

Optimiertes ELISA Protokoll für den iPr/Cl/C6-Tracer:

1. Vorcoaten: Ziege-anti-Maus Antikörper, Verdünnung 1:700 in Carbonat, 200 µL pro Kavität über Nacht bei 4°C
2. Waschen: 3xPBST
3. Coaten: K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> monoklonaler Antikörper, Verdünnung 1:50000, 200 µL pro Kavität, 3h, Raumtemperatur
4. Waschen: 3xPBST, 1xPBS
5. Konkurrenz: 100 µL Tracer, Verdünnung 1:10000 + 100µL PBS oder 100µL Atrazinstandard, 1.5h bei Raumtemperatur
6. Waschen: 3xPBST, 1xH<sub>2</sub>O
7. Substratumsatz: Substratlösung 1, über Nacht bei Raumtemperatur
8. Messen: Zugabe von 50 µl Chromogenlösung, Messung bei 450 nm im EIA-Reader

## 7.5. Immunoassay unter Verwendung des Di-Chloratrazin-Tracer

### 7.5.1 Optimierung des Assaysablaufs

Aufgrund der zuvor durchgeführten Untersuchung des Tracers wurde für den Immunoassay mit dem Di-Chloratrazin Tracer eine Verdünnung des Tracers von 1:6000 und 1:8000 ausgewählt.

In der Literatur wurde von einer Hemmung der  $\beta$ -Lactamase durch Chlorid-Ionen berichtet [165]. Deswegen wurde untersucht, ob ein Wechsel des Verdünnungspuffers von PBS zu PB einen Unterschied im Assay zur Folge hätte. Der Waschschrift zwischen der Immunreaktion und der Substratreaktion wurde entsprechend angepasst. Wurde PBS-Puffer als Verdünnungspuffer eingesetzt, ist PBST als Waschpuffer verwendet worden. Wurde PB als Verdünnungspuffer eingesetzt, wurde PBT als Waschpuffer verwendet.

Die Untersuchungen wurden mit dem folgenden ELISA Protokoll durchgeführt.

ELISA Protokoll:

1. Vorcoaten: Ziege-anti-Maus Antikörper, Verdünnung 1:700 in Carbonat, 200  $\mu$ L pro Kavität über Nacht bei 4°C
2. Waschen: 3xPBST
3. Coaten: K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> monoklonaler Antikörper, Verdünnung 1:50000, 200  $\mu$ L pro Kavität, 2.5h, Raumtemperatur
4. Waschen: 3xPBST, 1xPBS
5. Immunreaktion: 100  $\mu$ L Tracer, Verdünnung 1:10000 + 100 $\mu$ L Puffer (PBS oder PB) oder 100 $\mu$ L Atrazinstandard in PBS oder PB, 1.5h bei Raumtemperatur
6. Waschen: 3xPBST oder 3xPBT, 1xH<sub>2</sub>O
7. Substratumsatz: 200 $\mu$ L Substratlösung 1, über Nacht bei Raumtemperatur
8. Messen: Zugabe von 50  $\mu$ L Chromogenlösung, Messung bei 450 nm im EIA-Reader

Die folgenden Tabellen 7-5 und 7-6 enthalten die Ergebnisse der Untersuchung unter Verwendung von PBS als Puffer.

I <sub>50</sub> [ $\mu$ g/L]	20%B/B <sub>0</sub> [ $\mu$ g/L]	80% B/B <sub>0</sub> [ $\mu$ g/L]	Korrelation
0.353	0.077	1.787	0.998
0.419	0.101	2.680	0.994
0.428	0.127	2.111	0.996
0.381	0.090	1.896	0.998
X = 0.395 s = 0.0348 VK = 8.79%	X = 0.099 s = 0.0212 VK = 21.50%	X = 2.119 s = 0.398 VK = 18.78%	

Tab. 7-5 Ergebnisse des Immunoassays mit einer Di-Chloratrazin-Tracerverdünnung 1:6000 und einer K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> Verdünnung 1:50000. PBS-Puffer als Verdünnungspuffer der Immunreaktion. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Messungen.

$I_{50}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	20%B/B <sub>0</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	80% B/B <sub>0</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	Korrelation
0.254	0.054	1.159	1.000
0.242	0.054	1.385	0.998
0.324	0.067	1.890	0.997
0.275	0.051	1.782	0.996
X = 0.274 s = 0.0362 VK = 13.21%	X = 0.057 s = 0.0072 VK = 12.64%	X = 1.554 s = 0.341 VK = 21.96%	

Tab. 7-6 Ergebnisse des Immunoassays mit einer Di-Chloratrazin-Tracerverdünnung 1:8000 und einer K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> Verdünnung 1:50000. PBS-Puffer als Verdünnungspuffer der Immunreaktion. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Messungen.

Die folgenden Tabellen 7-7 und 7-8 enthalten die Ergebnisse der Untersuchung unter Verwendung von PB Puffer.

$I_{50}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	20%B/B <sub>0</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	80% B/B <sub>0</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	Korrelation
0.424	0.083	1.626	0.996
0.466	0.098	2.138	0.995
0.548	0.119	2.070	0.990
0.607	0.102	4.364	0.997
X = 0.511 s = 0.0820 VK = 16.04%	X = 0.101 s = 0.0148 VK = 14.73%	X = 2.550 s = 1.231 VK = 48.28%	

Tab. 7-7 Ergebnisse des Immunoassays mit einer Di-Chloratrazin-Tracerverdünnung 1:6000 und einer K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> Verdünnung 1:50000. PB-Puffer als Verdünnungspuffer der Immunreaktion. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Messungen.

$I_{50}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	20%B/B <sub>0</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	80% B/B <sub>0</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	Korrelation
0.327	0.044	2.468	0.997
0.537	0.080	2.933	0.998
0.470	0.097	2.933	0.994
0.525	0.142	2.664	0.998
X = 0.464 s = 0.0964 VK = 20.73%	X = 0.091 s = 0.0407 VK = 44.84%	X = 2.750 s = 0.2265 VK = 8.24%	

Tab. 7-8 Ergebnisse des Immunoassays mit einer Di-Chloratrazin-Tracerverdünnung 1:8000 und einer K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> Verdünnung 1:50000. PB-Puffer als Verdünnungspuffer der Immunreaktion. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Messungen.

Abbildung 7-13 zeigt die exemplarischen Kalibrierkurven, die erhalten wurden mit dem Di-Chloratrazin-Tracer in einer 1:6000 und 1:8000 Verdünnung.

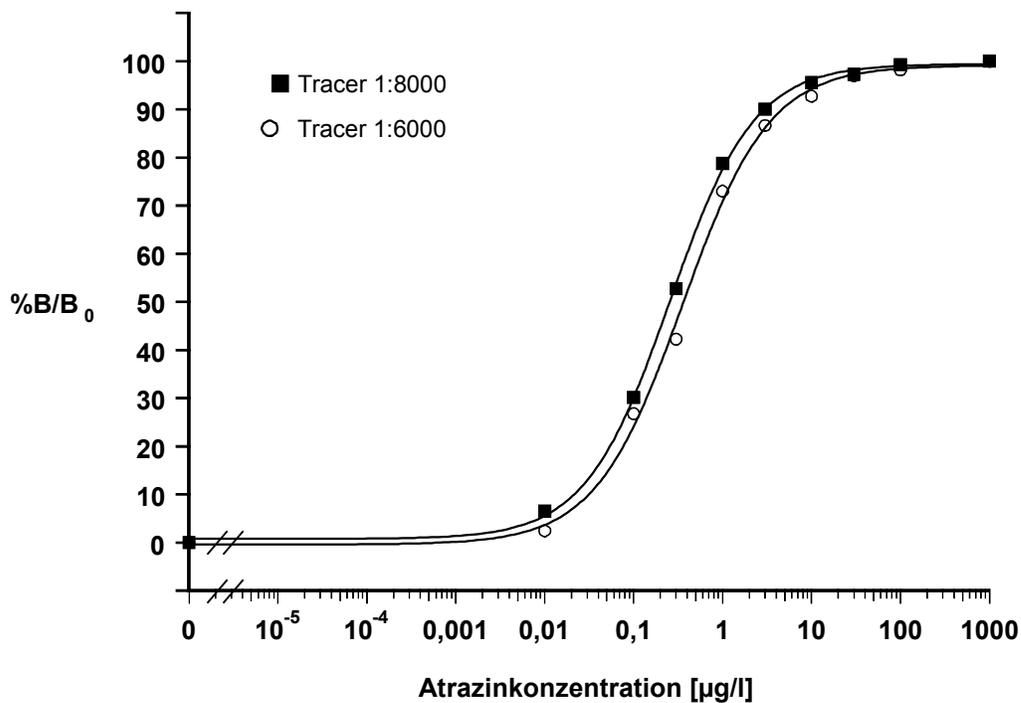


Abb. 7-13 Exemplarische Kalibrierkurven mit dem Di-Chloratrazin-Tracer. 2 verschiedene Tracerverdünnungen. Die K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnung betrug 1:50000. Als Verdünnungspuffer wurde PBS verwendet.

### 7.5.2 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse:

Durch die Verwendung eines Tracerderivates, welches eine geringere Affinität zum Antikörper aufwies, konnte eine deutliche Verbesserung im Testmittelpunkt erreicht werden. Das Detektionslimit liegt unterhalb der von der Europäischen Union geforderten  $0.1\mu\text{g/L}$  für ein einzelnes Pestizid. Eine Hemmung der  $\beta$ -Lactamase durch Chlorid-Ionen konnte nicht festgestellt werden. Ein deutlicher Einfluß auf den Testmittelpunkt durch die Verwendung von PB-Puffer konnte festgestellt werden. Die Verschlechterung des Testmittelpunktes durch die Verwendung von PB-Puffer als Verdünnungspuffer läßt sich darauf zurückführen, daß der Antikörper  $\text{K}_4\text{E}_7$  in PBS Puffer entwickelt worden ist. Die Verwendung von PB-Puffer hat einen Wechsel in der Ionenstärke zur Folge, und in dem vorliegenden Fall wird dann der Analyt schlechter erkannt, und der Testmittelpunkt verschlechtert sich. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf eine Verwendung von PB-Puffer verzichtet. Der Antikörper  $\text{K}_4\text{E}_7$  wurde mittels Aminocaprinsäuresimazin gekoppelt an KLH als Immunogen hergestellt. Aber wie auch in anderen Untersuchungen gezeigt worden ist, hat der Isopropylrest eine höhere Affinität zum Antikörper [178]. Es ist deswegen davon auszugehen, daß der Isopropylrest einen Einfluß auf die Affinität des Tracers zum Antikörper hat. Wenn man einen anderen Rest auswählt, dann ist mit einer weiteren Verminderung der Affinität des Tracers zum Antikörper zu rechnen und die große Anzahl an gekoppelten Haptenmolekülen spielt dann zunehmend eine geringere Rolle. Deswegen wurde als weiteres Hapten das Di-Chlorsimazin eingesetzt, bei welchem der Isopropylrest des Dichloratrazins durch einen Ethylrest ersetzt ist. Ein Ersatz des Chloratoms ist nicht anzuraten, da nach [68] das Chloratom essentiell für die Erkennung des Haptens durch den Antikörper  $\text{K}_4\text{E}_7$  ist.

Allgemein ist zu bemerken, daß der Dichloratrazin-Tracer nur eine Stabilität von einigen Wochen hatte. Nach 8 Wochen konnte ein Verlust der Aktivität des Tracers festgestellt werden. Das folgende Kapitel stellt die Ergebnisse, die mittels des Di-Chlorsimazin-Tracer erhalten wurden, dar.

Optimiertes ELISA-Protokoll für den Di-Chloratrazin-Tracer:

- |                     |   |
|---------------------|---|
| 1. Vorcoaten:       | mit Ziege-anti-Maus Antikörper Verdünnung 1:700 in Carbonatpuffer<br>200 $\mu\text{L}$ pro Kavität, über Nacht bei $4^\circ\text{C}$          |
| 2. Waschen :        | 3 x mit PBST  |
| 3. Coaten :         | mit $\text{K}_4\text{E}_7$ monoklonalem Antikörper Verdünnung 1:50000 in PBS-Puffer<br>200 $\mu\text{L}$ pro Kavität, 2.5h bei Raumtemperatur |
| 4. Waschen :        | 3 x mit PBST, 1 x mit PBS   |
| 5. Immunreaktion :  | 100 $\mu\text{L}$ Tracerverdünnung + 100 $\mu\text{L}$ PBS oder 100 $\mu\text{L}$ Atrazinstandard, 1.5h bei<br>Raumtemperatur                 |
| 6. Waschen :        | 3 x mit PBST; 1 x mit $\text{H}_2\text{O}$  |
| 7. Substratzugabe : | 200 $\mu\text{L}$ Substratlösung 1 in Wasser, Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur  |
| 8. Messen:          | Zugabe von 50 $\mu\text{L}$ HPTS-Lösung, Messen bei 450 nm mit dem EIA-Reader   |

## 7.6. Immunoassay unter Verwendung des Di-Chlorsimazin-Tracer

### 7.6.1 Optimierung des Assayablaufs

Aufgrund der zuvor durchgeführten Untersuchungen des Di-Chlorsimazin-Tracers wurde eine Verdünnung von 1:800 ausgewählt.

Es wurde zuerst das ELISA Protokoll, welches aus der Optimierung mittels des Di-Chloratsatrazin-Tracers erhalten wurde, angewendet. Eine Auswertung der Kurven war nur bedingt möglich, da der Überschußwert einen Absorptionswert zeigte, welcher sehr hoch oberhalb des Wertes von 100µg/L lag. Ein Wechsel in der Zusammensetzung der Substratlösung machte einen Einsatz des Di-Chlorsimazin-Tracers möglich. Anstelle von Natronlauge wurde PB-Puffer verwendet.

ELISA-Protokoll:

1. Vorcoaten: mit Ziege-anti-Maus Antikörper, Verdünnung 1:700 in Carbonatpuffer, 200 µL pro Kavität, über Nacht bei 4° C
2. Waschen : 3 x mit PBST
3. Coaten : mit K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> monoklonalem Antikörper Verdünnung 1:25000/50000 in PBS-Puffer, 200µL pro Kavität, 2.5h bei Raumtemperatur
4. Waschen : 3 x mit PBST, 1 x mit PBS
5. Immunreaktion : 100 µL Tracerverdünnung + 100µl PBS oder 100 µL Atrazinstandard, 1.5h bei Raumtemperatur
6. Waschen : 3 x mit PBST; 1 x mit H<sub>2</sub>O
7. Substratzugabe : 200 µL Substratlösung 3 in Wasser, Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur
8. Messen: Zugabe von 50 µL Chromogenlösung, Messung bei 450 nm mit dem EIA-Reader

Die folgenden Tabellen 7-9 und 7-10 enthalten die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Di-Chlorsimazin-Tracer.

I <sub>50</sub> [µg/L]	20 %B/B <sub>0</sub> [µg/L]	80 %B/B <sub>0</sub> [µg/L]	Korrelation
0.143	0.020	0.787	0.998
0.161	0.031	0.986	0.988
0.141	0.023	0.779	0.987
0.191	0.064	0.550	0.994
MW = 0.160 s = 0.023 VK = 14.2%	MW = 0.035 s = 0.020 VK = 58.6%	MW = 0.776 s = 0.178 VK = 22.9%	

Tab. 7-9 Ergebnisse des Immunoassays mit einer Di-Chlorsimazin-Tracerverdünnung 1:800 und einer K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> Verdünnung 1:25000. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Messungen.

$I_{50}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	20 %B/B <sub>0</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	80 %B/B <sub>0</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	Korrelation
0.067	0.004	0.741	0.993
0.061	0.007	0.660	0.995
0.076	0.005	0.913	0.976
0.066	0.005	0.668	0.968
MW = 0.068 s = 0.006 VK = 9.25%	MW = 0.005 s = 0.001 VK = 24.00%	MW = 0.746 s = 0.117 VK = 15.76%	

Tab. 7-10 Ergebnisse des Immunoassays mit einer Di-Chlorsimazin-Tracerverdünnung 1:800 und einer K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> Verdünnung 1:50000. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Messungen

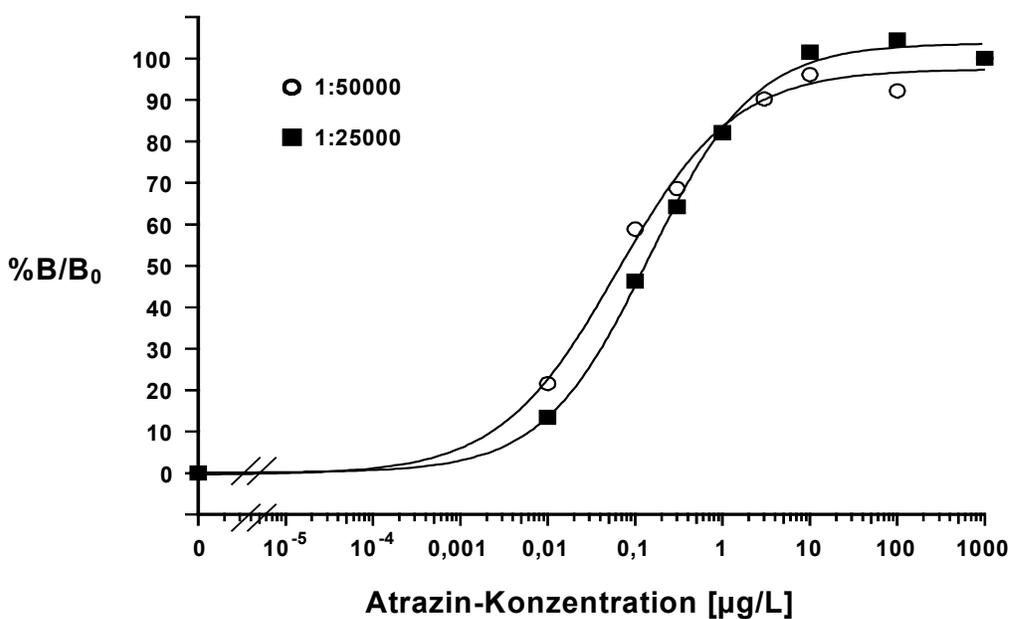


Abb. 7-14 Exemplarische Kalibrierkurve mit dem Di-Chlorsimazin-Tracer Verdünnung 1:800. K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnung 1:25000 und 1:50000.

### 7.6.2. Zusammenfassung und Diskussion

Durch die Verwendung des Di-Chlosimazin-Tracer konnte eine weitere Verbesserung des Testmittelpunktes erreicht werden. Die erreichten Detektionslimits unterschreiten bei weitem die von der Europäischen Union geforderten  $0,1\mu\text{g/L}$  für ein einzelnes Pestizid. Die Stabilität des Tracers betrug wie bei dem Di-Chloratrazin-Tracer nur wenige Wochen. Für die Übertragung des Immunoassays ist aber eine längere Stabilität von Vorteil, deswegen wurde der iPr/Cl/C6-Tracer nochmals hergestellt. Das folgende Kapitel stellt die Ergebnisse mit dem optimierten Immunoassay unter Verwendung des iPr/Cl/C6-Tracers zusammen.

## 7.7. Optimierung des Immunoassays für die Übertragung auf Polystyrolmikropartikel unter Verwendung des iPr/Cl/C6-Tracer

### 7.7.1 Optimierung des Immunoassays unter Verwendung des iPr/Cl/C6-Tracer

Aufgrund der zuvor durchgeführten Untersuchungen wurde eine Tracer-Verdünnung von 1:25000 und 1:35000 ausgewählt. Die Zusammensetzung der Substratlösung wurde nochmals variiert, da bei der Verwendung von PB-Puffer ein zu geringer Unterschied von Null- und Überschußprobe erzielt worden ist. Anstelle von PB-Puffer wurde Carbonatpuffer eingesetzt (Substratlösung 2).

Die Versuche wurden mit folgendem ELISA Protokoll durchgeführt:

ELISA-Protokoll:

1. Vorcoaten: mit Ziege-anti-Maus Antikörper, Verdünnung 1:850 in Carbonatpuffer, 200 µL pro Kavität, über Nacht bei 4° C
2. Waschen : 3 x mit PBST
3. Coaten : mit K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> monoklonalem Antikörper, verschiedene Verdünnung in PBS-Puffer, 200µL pro Kavität, 2.5h bei Raumtemperatur
4. Waschen : 3 x mit PBST, 1 x mit PBS
5. Immunreaktion : 100 µL Tracerverdünnung + 100µl PBS oder 100 µL Atrazinstandard, 1.5h bei Raumtemperatur
6. Waschen : 3 x mit PBST; 1 x mit H<sub>2</sub>O
7. Substratzugabe : 200 µL Substratlösung 2 in Wasser, Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur
8. Messen: Zugabe von 50 µL Chromogenlösung, Messung bei 450 nm mit dem EIA-Reader

Die folgenden Tabellen 7-11 und 7-12 enthalten die Ergebnisse die mit verschiedenen Antikörper-Verdünnungen und verschiedenen Tracerverdünnungen erhalten worden sind.

Antikörperverdünnung	I <sub>50</sub> [µg/L]	20%B/B <sub>0</sub> [µg/L]	80%B/B <sub>0</sub> [µg/L]	Korrelation
1:75000	3.765	1.008	14.524	0.998
	3.917	1.590	9.984	0.998
	2.976	0.881	11.573	0.999
	4.449	1.585	14.155	0.998
	MW = 3.776 s = 0.607 VK = 16.08%	MW = 1.266 s = 0.375 VK = 29.61%	MW = 12.559 s = 2.161 VK = 17.21%	
1:100000	2.472	0.698	10.469	0.999
	2.912	1.158	7.934	1.000
	2.357	0.638	9.542	0.999
	2.388	0.664	9.246	0.999
	MW = 2.532 s = 0.258 VK = 10.18%	MW = 0.790 s = 0.247 VK = 31.27%	MW = 9.298 s = 1.048 VK = 12.27%	

Tab. 7-11 Erhaltene Ergebnisse mit einer Tracerverdünnung des iPr/Cl/C6-Tracers von 1:25000 und unterschiedlichen K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnungen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Messungen.

Antikörperverdünnung	$I_{50}$ [µg/L]	20%B/B <sub>0</sub> [µg/L]	80%B/B <sub>0</sub> [µg/L]	Korrelation
1:75000	1.586	0.399	6.158	0.997
	1.609	0.384	7.576	0.999
	1.767	0.411	8.289	0.999
	1.609	0.287	8.843	0.999
	1.803	0.278	9.597	0.998
	MW = 1.675 s = 0.102 VK = 6.08%	MW = 0.352 s = 0.064 VK = 18.21%	MW = 8.093 s = 1.311 VK = 16.20%	
1:100000	1.155	0.205	6.364	0.999
	1.292	0.353	5.099	0.999
	1.324	0.285	6.208	0.999
	1.225	0.295	7.150	0.997
	1.125	0.246	5.265	0.999
	MW = 1.224 s = 0.085 VK = 6.98%	MW = 0.277 s = 0.055 VK = 20.04%	MW = 6.017 s = 0.844 VK = 14.03%	

Tab. 7-12 Erhaltene Ergebnisse mit einer Tracerverdünnung des iPr/Cl/C6-Tracers von 1:35000 und unterschiedlichen K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnungen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Messungen.

Wie schon bei der Herstellung des ersten Tracers mit dem Hapten iPr/Cl/C6 sind die Testmittelpunkte noch nicht ausreichend, um die Vorgaben der Europäischen Union zu erfüllen. Es wurde versucht, durch eine erhöhte Zugabe von Carbonatpuffer (Substratlösung 4) die Abnahme des pH-Wertes zu verlangsamen und so eine Verbesserung der Testmittelpunkte zu erzielen. Die folgende Tabelle 7-13 enthält die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen mit dem iPr/Cl/C6-Tracer in einer Verdünnung von 1:20000 und verschiedenen K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnungen.

Antikörperverdünnung	$I_{50}$ [µg/L]	20%B/B <sub>0</sub> [µg/L]	80%B/B <sub>0</sub> [µg/L]	Korrelation
1:25000	1.628	0.383	6.669	1.000
	2.012	0.354	9.254	0.999
	1.655	0.271	9.441	0.997
	1.311	0.381	5.351	0.997
	1.240	0.226	5.512	1.000
	MW = 1.569 s = 0.309 VK = 19.69%	MW = 0.323 s = 0.071 VK = 21.91%	MW = 7.245 s = 1.986 VK = 27.41%	
1:50000	1.434	0.201	8.268	0.996
	1.121	0.183	6.862	0.998
	1.227	0.274	4.802	0.999
	1.160	0.266	6.772	0.996
	1.446	0.262	10.041	0.995
	1.100	0.186	5.037	0.998
	MW = 1.248 s = 0.155 VK = 12.41%	MW = 0.229 s = 0.043 VK = 18.79%	MW = 6.964 s = 1.980 VK = 28.43%	

Tab. 7-13 Erhaltene Ergebnisse mit einer Tracerverdünnung des iPr/Cl/C6-Tracer von 1:20000 und unterschiedlichen K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnungen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 5 bzw. 6 unabhängigen Messungen.

Eine weitere Verdünnung des Antikörpers konnte nicht durchgeführt werden, da so der erreichte Unterschied zwischen Nullprobe und Überschußprobe zu gering war.

### 7.7.2 Einfluß von Huminstoffen auf den Immunoassay

Es sind bei der Messung von realen Proben im Immunoassay oft Einflüsse der Probenmatrix auf das erhaltene Ergebnis festgestellt worden. In realen Proben sind sehr häufig Huminstoffe enthalten. Diese Huminstoffe sind große organische Polymere mit einem Molekulargewicht von 2000-50000. Sie bestehen aus einem polycyclischen Kern und locker gebundenen Polysacchariden, Proteinen und einfachen Phenolen. Sie weisen verschiedene funktionelle Gruppen auf, wie z.B. Carbonyl-, Carboxyl-, Hydroxy- und Aminogruppen. Huminsäuren bilden Chelate mit Schwermetallionen wie Cadmium und Blei [40]. Sie enthalten hydrophile und hydrophobe Bereiche, die mit Pestiziden reagieren können [93, 179, 180]. S-Triazine werden hauptsächlich über ionische Bindungen und Wasserstoff-Bindungen an Huminstoffe gebunden [181]. Bis zu 50% der ausgebrachten Menge an Atrazin wurden als im Boden gebunden ermittelt [93]. Wenig ist bis jetzt bekannt über die gebundene Menge an Pestiziden an wasserlösliche Huminstoffe oder ihren Transport in die verschiedenen Kompartimente der Umwelt [93]. Der Gehalt an Huminstoffen in realen Wasserproben ist sehr unterschiedlich, doch meist liegt er für Oberflächenwasser zwischen 1-10mg/L [182].

Um den Einfluß von Huminstoffen auf den Immunoassay zu testen, wurden außer Atrazinstandardlösungen auch Atrazinstandardlösungen verwendet, die mit Huminstofflösung versetzt wurden. Der Immunoassay wurde nach dem optimierten Assay-Protokoll durchgeführt. Die folgenden Abbildungen 7-15 bis 7-18 zeigen die gefundenen und erwarteten Konzentrationen an Atrazin unter Verwendung verschiedener Gehalte an Huminsäure.

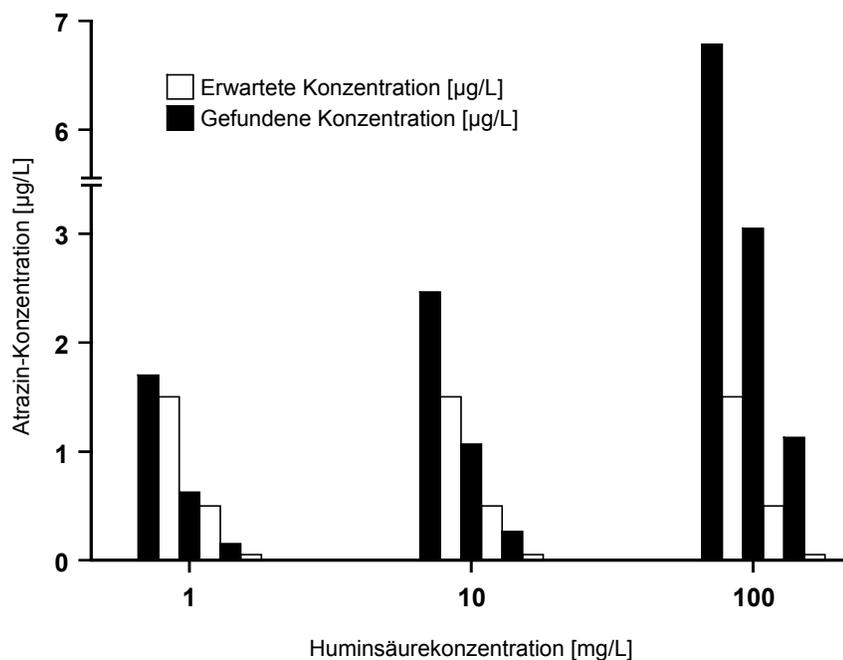


Abb. 7-15 Einfluß verschiedener Huminsäurekonzentrationen auf die Wiederfindungsraten von Atrazin. Die  $K_4E_7$ -Verdünnung betrug 1:75000 und die Tracer-Verdünnung 1:25000.

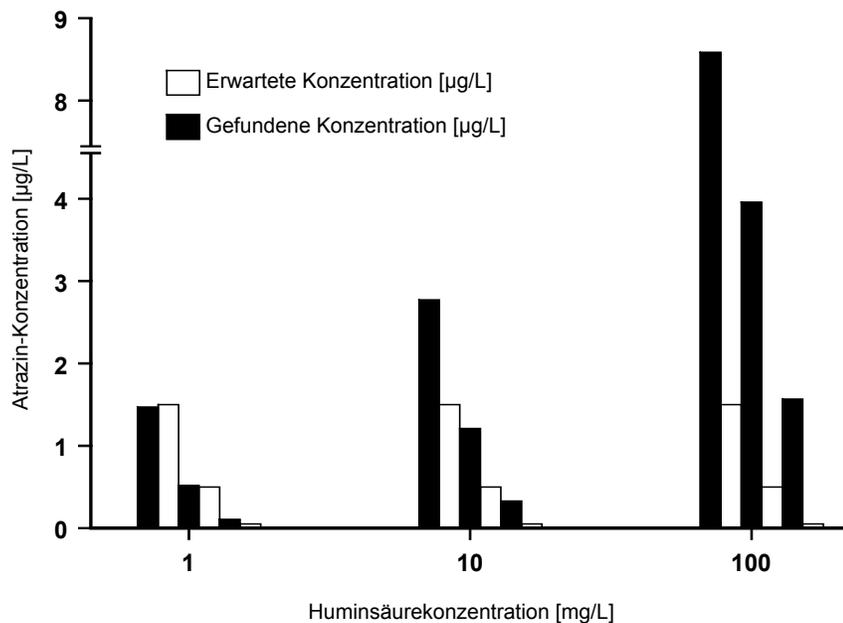


Abb. 7-16 Einfluß verschiedener Huminsäurekonzentrationen auf die Wiederfindungsraten von Atrazin. Die  $K_4E_7$ -Verdünnung betrug 1:75000 und die Tracerverdünnung 1:35000.

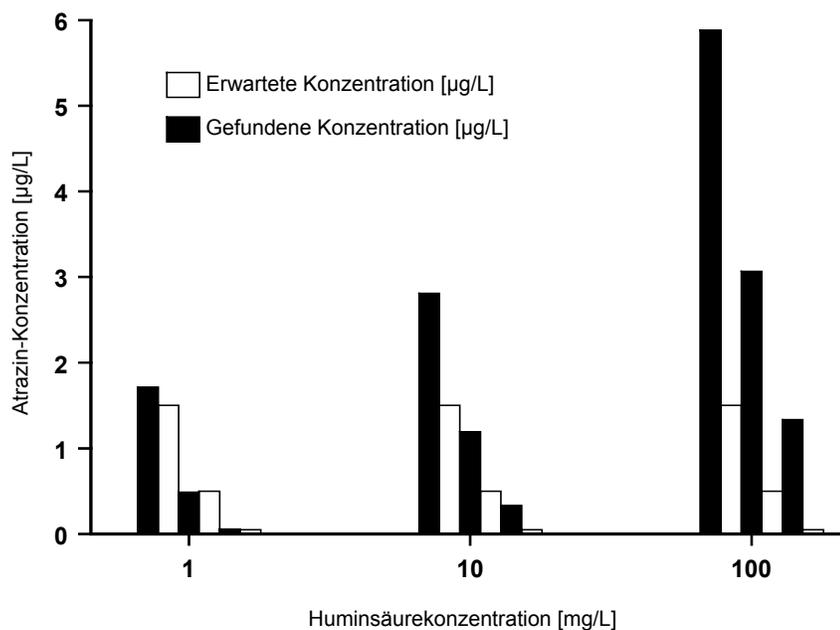


Abb. 7-17 Einfluß verschiedener Huminsäurekonzentrationen auf die Wiederfindungsraten von Atrazin. Die  $K_4E_7$ -Verdünnung betrug 1:100000 und die Tracerverdünnung 1:25000.

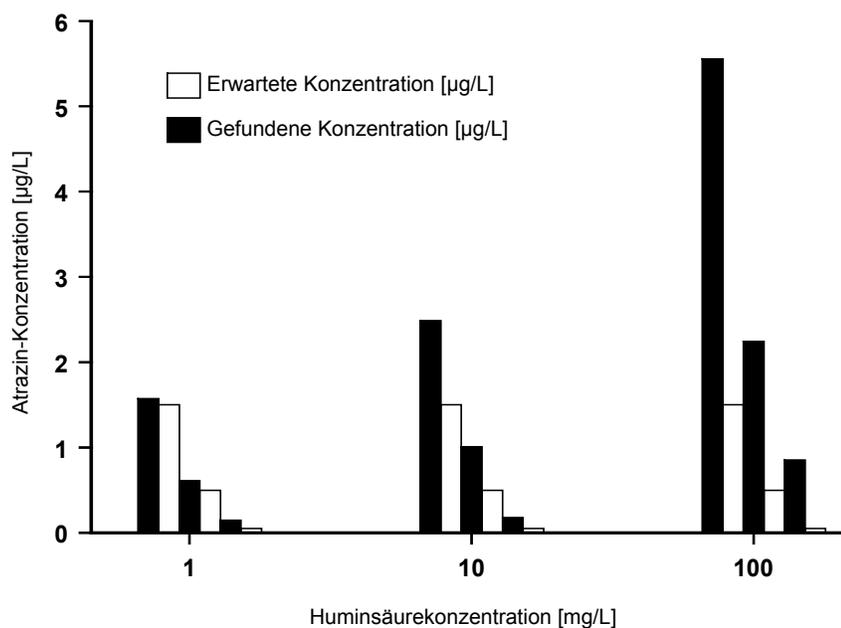


Abb. 7-18 Einfluß verschiedener Huminsäurekonzentrationen auf die Wiederfindungsraten von Atrazin. Die  $K_4E_7$ -Verdünnung betrug 1:100000 und die Tracerverdünnung 1:35000.

Der Einfluß von Huminstoffen auf den Immunoassay zeigt sich in einer niedrigeren Absorption der Proben, damit wird ein höherer Atrazin-Gehalt vorgetäuscht. Dies steht in gutem Einklang mit Befunden, die von anderen Arbeitsgruppen erhalten worden sind [182]. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß Gehalte bis 1mg/L an Huminsäure durch den Antikörper toleriert werden.

	Atrazin-Konzentration [µg/L]	Gefunden bei 1mg/L Huminsäure [µg/L]	Gefunden bei 10mg/L Huminsäure [µg/L]	Gefunden bei 100mg/L Huminsäure [µg/L]
K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> -Verdünnung 1:75000 Tracer- Verdünnung 1:25000	0.05	0.152	0.265	1.125
	0.5	0.622	1.065	3.045
	1.5	1.699	2.462	6.783
K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> -Verdünnung 1:75000 Tracer- Verdünnung 1:35000	0.05	0,105	0,331	1,565
	0.5	0,520	1,210	3,958
	1.5	1,469	2,769	8,585
K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> -Verdünnung 1:100000 Tracer- Verdünnung 1:25000	0.05	0,058	0,335	1,332
	0.5	0,488	1,196	3,068
	1.5	1,716	2,808	5,878
K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> -Verdünnung 1:100000 Tracer- Verdünnung 1:25000	0.05	0,145	0,179	0,855
	0.5	0,610	1,009	2,243
	1.5	1,574	2,484	5,557

Tab. 7-14 Erwartete und gefundene Atrazin-Konzentrationen bei unterschiedlichen Tracer- und Antikörper-Verdünnungen und unterschiedlichen Huminsäure-Konzentrationen.

### 7.7.3. Zusammenfassung und Diskussion

Der hergestellte Tracer mit dem Hapten iPr/Cl/C6 konnte in einem kompetitiven Immunoassay erfolgreich eingesetzt werden. Die erreichten Testmittelpunkte erreichen zwar nicht das von der Europäischen Union geforderte Limit von 0.1µg/L für ein einzelnes Pestizid, dafür konnte dieser Tracer über zwei Jahre im Immunoassay ohne Verlust der Aktivität und Bindungsfähigkeit eingesetzt werden. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Übertragung auf die Polystyrol-Mikropartikel, da nur dadurch eine wiederholte Tracersynthese wegfällt und die damit verbundenen Validierungsexperimente.

Eine Erhöhung des Anteils an Carbonatpuffer in der Substratlösung zeigte nicht den erhofften Erfolg auf Verbesserung des Testmittelpunktes. Die erreichten Werte bei einer Tracerverdünnung von 1:20000 und einer Antikörperverdünnung von 1:50000 waren die gleichen, wie bei einer Tracerverdünnung von 1:35000 und einer Antikörperverdünnung von 1:100000 mit niedrigerem Carbonatanteil. Deswegen ist der höheren Tracer-Verdünnung und der höheren Antikörperverdünnung der Vorzug zu geben, denn durch die höhere Verdünnung können Tracer- und Antikörper-Lösung eingespart werden. Desweiteren war der Unterschied in der Absorption zwischen Nullprobe und Überschußprobe bei den höheren Verdünnungen höher.

Das optimierte Assayprotokoll war das folgende:

#### ELISA-Protokoll:

- |                     |   |
|---------------------|---|
| 1. Vorcoaten:       | mit Ziege-anti-Maus Antikörper, Verdünnung 1:850 in Carbonatpuffer, 200 µL pro Kavität, über Nacht bei 4° C                             |
| 2. Waschen :        | 3 x mit PBST  |
| 3. Coaten :         | mit K <sub>4</sub> E <sub>7</sub> monoklonalem Antikörper Verdünnung 1:100000 in PBS-Puffer, 200µL pro Kavität, 2.5h bei Raumtemperatur |
| 4. Waschen :        | 3 x mit PBST, 1 x mit PBS   |
| 5. Immunreaktion :  | 100 µL Tracerverdünnung 1:35000 + 100µl PBS oder 100 µL Atrazinstandard, 1.5h bei Raumtemperatur  |
| 6. Waschen :        | 3 x mit PBST; 1 x mit H <sub>2</sub> O  |
| 7. Substratzugabe : | 200 µL Substratlösung 2 in Wasser, Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur   |
| 8. Messen:          | Zugabe von 50 µL Chromogenlösung, Messung bei 450 nm mit dem EIA-Reader   |

#### Huminstoffe:

Wie die Versuche unter Verwendung unterschiedlicher Huminstoff-Konzentrationen gezeigt haben ist durch die Huminstoffe eine Erhöhung der Absorption der Probe verbunden. Dadurch werden erhöhte Atrazin-Konzentrationen vorgespiegelt. Erst bei Konzentrationen von 1mg/L Huminsäure wird keine Beeinflussung der Wiederfindungsraten des Atrazins mehr gefunden.

## 7.8 Übertragung des Immunoassays auf Polystyrolmikropartikel

### 7.8.1 Einleitung

In den letzten Jahren sind erfolgreich verschiedenen feste Phasen in ELISA's eingesetzt worden. So existieren viele Immunoassays unter Verwendung von Magnetpartikeln als feste Phase [183-187]. Es sind auch carboxylierte Latexpartikel zur kovalenten Kopplung von IgG hergestellt worden [188, 189]. Es wurden auch Glaspartikel als feste Phase zur kovalenten Immobilisierung von Antikörpern in einem Durchflußsystem verwendet [190]. Es ist ein Immunoassay beschrieben worden, welcher eine Polystyrolperle ( $\varnothing = 6.4\mu\text{m}$ ) als feste Phase verwendete [191]. Bis jetzt ist aber noch kein Immunoassay bekannt, der unmodifizierte Polystyrolmikropartikel als feste Phase verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurden Polystyrolmikropartikel der Größe  $1\mu\text{m}$  verwendet. Die Polystyrolmikropartikel werden von der Firma Polyscience Inc. hergestellt. Die Partikel wurden als 2.5%ige Lösung in Wasser geliefert. Der Suspension waren keine Additive zugefügt.

### 7.8.2. Vorbereitende Untersuchungen

#### 7.8.2.1. Zentrifugation der Mikropartikel

Am Beginn der Untersuchungen war eine Zentrifuge von Sigma in Gebrauch. Dieses Gerät lieferte eine Umdrehungszahl von 3000rpm. Dies entspricht bei dieser Zentrifuge einer Zentrifugalkraft von 1200G. In einem Gefäß von 2.5cm Höhe sollten sich die Polystyrolmikropartikel dann innerhalb von 15 Minuten abgesetzt haben. In der Praxis kann der effektive Zeitaufwand, um ein akzeptables Pellet zu formen, noch 50% höher sein. Die Zeit hängt stark von der Partikelkonzentration und der Brownschen Bewegung ab [192]. Es wurden daher Untersuchungen zur Zentrifugation der Polystyrolmikropartikel in verschiedenen Puffern durchgeführt.

Eine Verdünnung von je  $20\mu\text{L}$  Polystyrolmikropartikelsuspension in PBS Puffer, Carbonat Puffer, Wasser und PBST wurden unterschiedlichen Zentrifugationsdauern unterworfen.

Tabelle 7-15 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

rpm	Dauer	Puffer	Ausformung des Pellet
1500	5 Minuten	PBS Carbonat PBST Wasser	- - - -
3000	5 Minuten	PBS Carbonat PBST Wasser	- - -/+ -/+
3000	15 Minuten	PBS Carbonat PBST Wasser	0 (Trübung) 0 (Trübung) + +

Tab. 7-15 Einfluß von unterschiedlichen Drehzahlen und Zentrifugationsdauern auf die Ausformung eine Pellet der Polystyromikropartikel in verschiedenen Pufferlösungen.

Die Verdünnung in PBS und Carbonat waren selbst nach 15 Minuten bei 3000rpm noch etwas trübe. Auch durch weiteres Zentrifugieren konnte bei PBS und Carbonat die Trübung nicht entfernt werden, es waren aber Polystyrolmikropartikel am Boden des Zentrifugengefäßes abgesetzt. Es wurde nun versucht, die überstehende Lösung mit Hilfe einer speziellen Pipettenspitze zu entfernen. Bei den Verdünnungen in Wasser und PBST konnte die überstehende Lösung problemlos entfernt werden. Bei PBS und Carbonat war die Entnahme der Flüssigkeit problematischer. Es bildete sich ein Film an der Oberfläche des Zentrifugengefäßes aus, an dem ein Teil der Polystyrolmikropartikel anhaftete. Diese Erkenntnis ist wichtig, da bei der Übertragung des Immunoassays auf die Polystyrolmikropartikel Verdünnungen in PBS und Carbonat durchgeführt werden müssen, aber gleichzeitig bei der Entfernung der einzelnen Lösungen keine zu großen Verluste an Partikeln auftreten sollen. Bei zu großen Verlusten ist anzunehmen, daß die Variation innerhalb der durchgeführten Immunoassays stark zunimmt. Um diesem Effekt vorzubeugen, wurde vor der eigentlichen Reaktion ein Waschschriff der Partikel mit PBST durchgeführt. Danach konnte eine Anhaftung der Partikel an der Oberfläche und die Trübung der Lösung nicht mehr beobachtet werden.

#### 7.8.2.2. Adsorption von Antikörpern an die Oberfläche der Polystyrolmikropartikel (PSMP)

Die ersten Experimente zur adsorptiven Kopplung von Antikörpern an die Oberfläche der Partikel wurden mit folgendem System durchgeführt:

1. Vorbereitung: 25µl Partikellösung einmal mit 1 mL PBST gewaschen, abzentrifugiert.
2. Vorcoaten: 5 µL Ziege-anti-Maus Antikörper in 1mL Carbonat, die Partikel durch einen Vortexmischer aufgeschlämmt, Inkubation der Partikel über Nacht bei Raumtemperatur.
3. Waschen: 20 Minuten abzentrifugiert und die überstehende Lösung abgesaugt, einmal mit PBST und einmal mit PBS gewaschen.
4. Immunreaktion: Zugabe von 4µL einer 1:100 K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> Verdünnung + 1 mL PBS, Inkubation für 1.5h bei Raumtemperatur.
5. Waschen: 20 Minuten abzentrifugiert und die überstehende Lösung abgesaugt, einmal mit PBST und einmal mit PBS gewaschen.
6. Nachweis: 10µL Ziege-anti-Maus-Peroxidase Konjugatlösung + 1mL PBS Inkubation für 1h
7. Waschen: 20 Minuten abzentrifugiert und die überstehende Lösung abgesaugt, einmal mit PBST und einmal mit PBS gewaschen.
8. Substratreaktion: Substratlösung 5, nach ausreichender Farbentwicklung mit 4N HCl die Reaktion gestoppt.
9. Messung: Bei 490nm mittels des EIA-Reader

Die Messung ergab eine Absorption von 0.5. Es konnte damit nachgewiesen werden, daß eine Adsorption des Antikörpers an die Polystyrolmikropartikel stattgefunden hat.

Bei der Übertragung des Immunoassays auf die Polystyrolmikropartikel muß bedacht werden, daß mit der Verwendung solch kleiner Partikel eine Vergrößerung der Oberfläche zu verzeichnen ist. Eine direkte Übertragung der Verdünnungen aus dem optimierten Immunoassay ist nicht möglich, da diese Verdünnungen auf die Oberfläche der Mikrotiterplatte abgestimmt worden sind. Um eine Abschätzung zu machen, welche Konzentrationen in der Mikrotiterplatte verwendet worden sind und welche Konzentrationen für die Mikropartikel angenommen werden müssen, wurde die benetzte Oberfläche der Mikrotiterplatte bei einem pipettierten Volumen von 200µL herangezogen. Nach [193] beträgt die benetzte Oberfläche einer Kavität 154mm<sup>2</sup> bei einem Volumen von 200µL. Der Ziege-anti-Maus Antikörper wurde in einer Konzentration von 4.5mg/mL geliefert. Dies bedeutet, daß bei einer Verdünnung von 1:850 eine Menge von 13.9ng an Antikörper pro mm<sup>2</sup> zur Verfügung steht. Nach [45] ist eine Polystyroloberfläche fähig, 1.5ng/mm<sup>2</sup> zu binden. Das heißt, daß in der Mikrotiterplatte ein 9.3 facher Überschuß an Antikörper vorgelegen hat. Die Anzahl an Polystyrolmikropartikel liegt bei  $4.55 \cdot 10^{10}$  pro mL. Wird ein Volumen von 10µL Polystyrolmikropartikellösung verwendet, entspricht dies einer Oberfläche von 1429mm<sup>2</sup> oder 9.3 Kavitäten in der Mikrotiterplatte. Es wurde für den Immunoassay ein 5 facher Überschuß an Ziege-anti-Maus Antikörper ausgewählt, da die Wege, die ein Antikörpermolekül innerhalb der Mikropartikellösung zurücklegen muß, bis es auf eine Polystyrolkugel trifft um zu binden, wesentlich kleiner sind, als die Wege, die der Antikörper in einer Kavität der Mikrotiterplatte zurücklegen muß, bis er auf die Wand stößt und binden kann. Es wurden damit 1.9µL Ziege-anti-Maus Antikörper Lösung mit 10µL Polystyrolmikropartikel in einem Volumen von 400µL Carbonat zur Reaktion gebracht. Um

eine bessere Absetzbarkeit der Mikropartikel zu erreichen wurde nach der Inkubation der verschiedenen Lösungen 20µL einer Verdünnung von 5µL Tween 20 in 5mL dest. Wasser zugegeben. Durch die Zugabe des Detergenzes wurde die Oberflächenspannung des Puffers herabgesetzt und die Zentrifugation erleichtert.

Als nächster Schritt sollte untersucht werden wie die Verdünnungen von K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> und Tracer anzusetzen sind.

Es wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet:

1. Vorbereitung der (PSMP): 10µL PSMP wurden mit 400µL PBST gewaschen und abzentrifugiert (20min).
2. Vorcoaten: PSMP + 400µL Carbonat + 1.9µL Ziege-anti-Maus Antikörper, über Nacht bei 4°C.
3. Waschen: + 20µL Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung, + 400µL PBST, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung.
4. Immunreaktion: PSMP + 400µL PBS + 6µL einer 1:100 K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnung, 3h bei Raumtemperatur
5. Waschen: + 20µL Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung, + 400µL PBST, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung.
6. Konkurrenz: Zugabe von 400µL PBS, aufteilen der entstehenden Suspension in zwei neue Zentrifugengefäße à 200µL. Zugabe von einmal 200 µL Atrazin (c = 1000µg/L) und einmal 200 µL PBS (Nullprobe). Zugabe von je 0.4 µL Tracer, 1 h bei Raumtemperatur.
7. Waschen: + 20µL Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung, + 400µL Wasser dest., Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung.
8. Substratreaktion: 400µL Wasser + 50µL Penicillin-Stammlösung + 60µL Carbonat, Über Nacht bei Raumtemperatur.
9. Messen: Zugabe von je 100µL Chromogen-Lösung. Überführen von je zweimal 200 µL in Kavitäten der Mikrotiterplatte. Messung bei 450nm im EIA-Reader.

Als Vergleich wurde die Substratlösung ohne beschichtete Mikropartikel vermessen.

Die folgende Tabelle 7-16 enthält die Ergebnisse dieses Versuches:

Probe	Absorption
Substratlösung	0.600
Nullprobe	0.129
Überschußprobe	0.153

Tab. 7-16 Erhaltene Ergebnisse zur Untersuchung der Übertragbarkeit des Immunoassays auf Polystyrolmikropartikel.

Der Unterschied zwischen Nullprobe und Überschussprobe ist nur gering. Es kam die Vermutung auf, daß unter Umständen Tracer an der Wand des Zentrifugengefäßes, trotz der

Waschvorgänge, haften blieb. Es wurde deswegen ein Zentrifugengefäß mit 400µL PBS gefüllt und 0.4 µL Tracer zugegeben. Nach 0.5 h wurde das Zentrifugengefäß gewaschen und Substratlösung zugegeben. Nach 2h konnte eine Entfärbung der HPTS-Lösung beobachtet werden. Deswegen wurde für alle nachfolgenden Versuche andere Zentrifugengefäße verwendet. Diese Gefäße wurden von der Firma Roth hergestellt unter Verwendung von hochreinem Polypropylen. Diese Gefäße zeigten keine Adsorption des Tracers oder anderer Proteine.

### 7.8.2.3 Optimierung des Immunoassays unter Verwendung der Polystyrolmikropartikel

Es wurden nun Versuche unter Einsatz unterschiedlicher K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnungen durchgeführt: Die Versuche wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Vorbereitung der PSMP: 2x 20µL PSMP wurden mit 800µL PBST gewaschen und abzentrifugiert (20min).
2. Vorcoaten: 2x + 800µL Carbonat + 3.8µL Ziege-anti-Maus Antikörper, über Nacht bei 4°C.
3. Waschen: + 20µL Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung, + 800µL PBST, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung.
4. Immunreaktion: 2x + 400µL PBS, Vereinigen der Suspensionen, Aufteilen der entstehenden Suspension in 4 neue Zentrifugengefäße à 200µL, + 200µL PBS, Zugabe von 6µL, 3µL, 2µL, 1.5µL einer 1:100 K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnung (entspricht 1:30000, 1:60000, 1:100000, 1:125000 in der Mikrotiterplatte), 3h bei Raumtemperatur
5. Waschen: + 20µL Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung, + 400µL PBST, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung.
6. Konkurrenz: Zugabe von 400µL PBS, Aufteilen der entstehenden Suspension in zwei neue Zentrifugengefäße à 200µL. Zugabe von einmal 200 µL Atrazin (c = 1000µg/L) und einmal 200 µL PBS (Nullprobe). Zugabe von je 16 µL Tracer (entspricht einer 1:6000 Verdünnung in der Mikrotiterplatte), 1 h bei Raumtemperatur.
7. Waschen: + 20µL Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung, + 400µL Wasser dest., Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung.
8. Substratreaktion: 400µL Wasser + 0.04mL Penicillin-Stammlösung + 0.048mL Carbonat, über Nacht bei Raumtemperatur.
9. Messen: Zugabe von je 100µL Chromogen-Lösung. Zentrifugation für 20min. Überführen von je zweimal 200 µL in Kavitäten der Mikrotiterplatte. Messung bei 450nm im EIA-Reader.

Die folgende Grafik 7-19 zeigt die erhaltenen Ergebnisse auf:

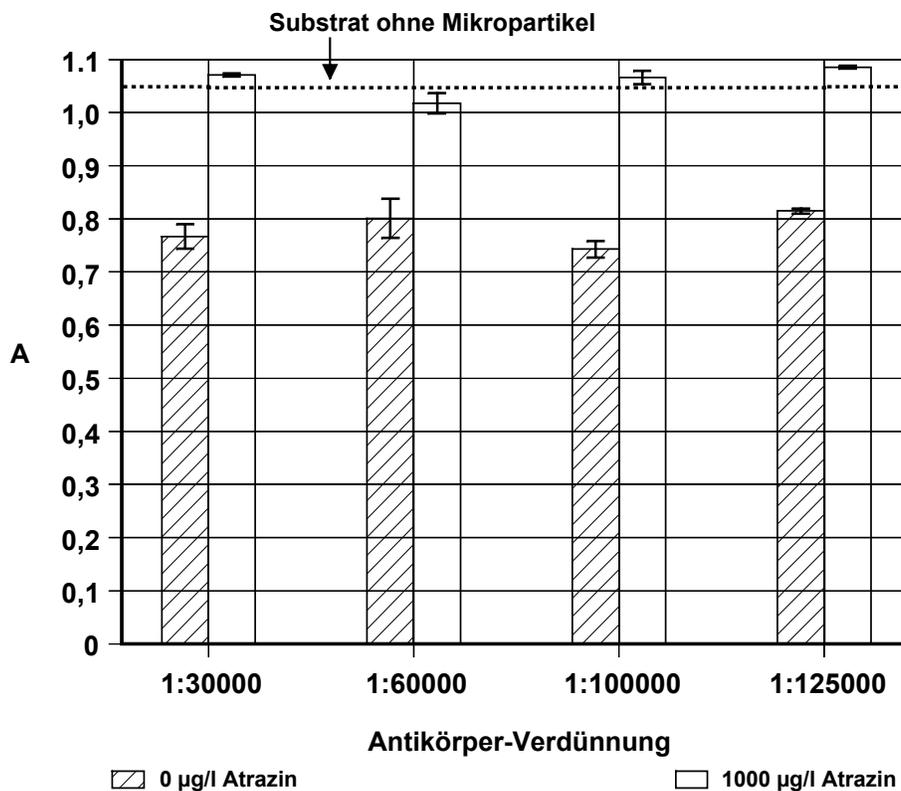


Abb. 7-19 Untersuchung der Absorption von Null- und Überschußprobe bei 4 verschiedenen Antikörper-Verdünnungen.

Bei der Verwendung dieser Gefäße (Fa. Roth) konnte nicht mehr die Anhaftung einer Verdünnung von Polystyrolmikropartikeln in PBS oder Carbonat an der Oberfläche der Zentrifugengefäße beobachtet werden. Deswegen wurde auf das Waschen mit PBST vor der Beschichtung der Mikropartikel verzichtet.

Der Unterschied zwischen Nullprobe und Überschußprobe ist mit 0.22-0.3 Absorptionseinheiten noch nicht genügend groß, deswegen wurde untersucht, wie sich Tracerkonzentration und Carbonatzusatz in der Substratlösung auswirkt.

Das Experiment wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Vorcoaten: 2x 20 $\mu$ L PSMP + 3.8 $\mu$ L Ziege-anti-Maus + 800 $\mu$ L Carbonat, über Nacht bei 4°C.
2. Waschen: + 20 $\mu$ L Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung, + 800 $\mu$ L PBST, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung.
3. Immunreaktion: 2x + 400 $\mu$ L PBS, Vereinen der Suspensionen, Aufteilen der entstehenden Suspension in 2 neue Zentrifugengefäße à 400 $\mu$ L, + 400 $\mu$ L PBS, Zugabe von 12 $\mu$ L, 6 $\mu$ L, einer 1:100 K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnung (entspricht 1:30000, 1:60000), in der Mikrotiterplatte), 3h bei Raumtemperatur
4. Waschen: + 20 $\mu$ L Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung, + 800 $\mu$ L PBST, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung.
5. Konkurrenz: 2x Zugabe von 400 $\mu$ L PBS, Aufteilen der entstehenden Suspension in zwei neue Zentrifugengefäße à 200 $\mu$ L. Zugabe von einmal 200  $\mu$ L Atrazin (c = 1000 $\mu$ g/L) und einmal 200  $\mu$ L PBS (Nullprobe). Zugabe von je 100  $\mu$ L Tracer-Verdünnung (4 $\mu$ L Tracer in 5mL PBS; entspricht einer 1:25000 Verdünnung in der Mikrotiterplatte), 1h bei Raumtemperatur.
6. Waschen: + 20 $\mu$ L Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung, + 400 $\mu$ L Wasser dest., Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung.
7. Substratreaktion: Substratlösung 8: 4mL Wasser + 0.4mL Penicillin-Stammlösung + 0.48mL Carbonat; Substratlösung 9: 4mL Wasser + 0.4mL Penicillin-Stammlösung + 0.25mL Carbonat; Zugabe von 400 $\mu$ L Substrat, Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur.
8. Messen: Zugabe von je 100 $\mu$ L Chromogen-Lösung. Zentrifugation für 20min. Überführen von je zweimal 200  $\mu$ L in Kavitäten der Mikrotiterplatte. Messung bei 450nm im EIA-Reader.

Die folgende Abbildung 7-20 zeigt die Ergebnisse.

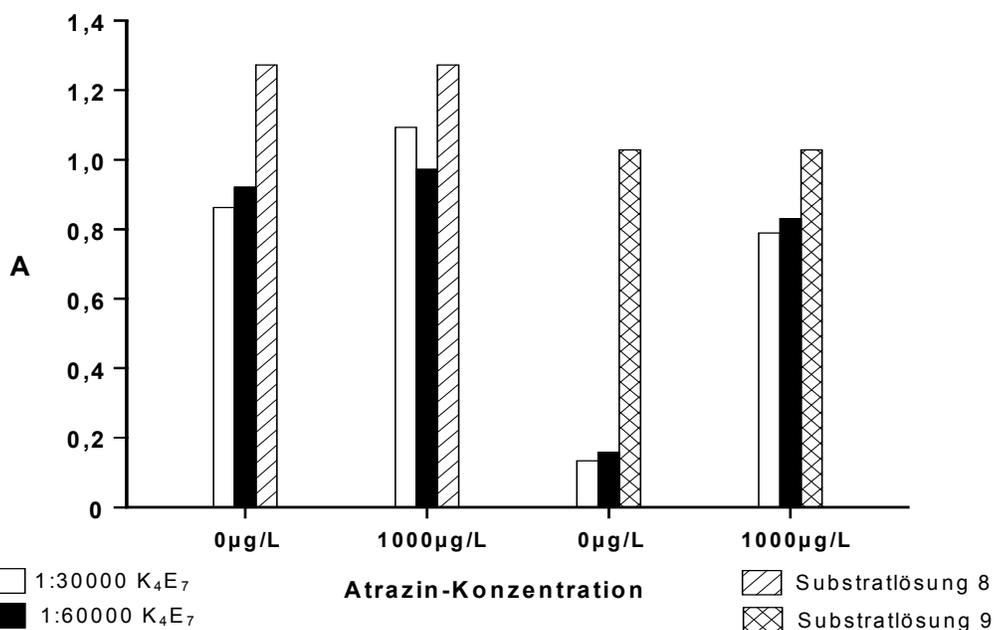


Abb. 7-20 Ergebnisse aus der Untersuchung der Antikörper Konzentration und der Substrat Zusammensetzung auf den Unterschied zwischen Nullprobe und Überschußprobe im Vergleich zur Absorption der reinen Substratlösung.

Den größten Unterschied zwischen Null- und Überschußprobe wurde mit Substratlösung 9 und einer  $K_4E_7$ -Verdünnung von 1:60000 erhalten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden diese Verdünnung und Substratzusammensetzung für einen ersten Immunoassay auf Polystyrolmikropartikel mit verschiedenen Atrazinkonzentrationen verwendet.

1. Vorcoaten: 2x 20 $\mu$ L PSMP + 3.8 $\mu$ L Ziege-anti-Maus + 800 $\mu$ L Carbonat, über Nacht bei 4°C.
2. Waschen: + 20 $\mu$ L Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung, + 800 $\mu$ L PBST, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung.
3. Immunreaktion: 2x + 400 $\mu$ L PBS, Vereinigen der Suspensionen, Zugabe von 12 $\mu$ L einer 1:100  $K_4E_7$ -Verdünnung (entspricht 1:60000), in der Mikrotiterplatte), 3h bei Raumtemperatur
4. Waschen: + 20 $\mu$ L Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung, + 800 $\mu$ L PBST, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung.
5. Konkurrenz: Zugabe von 800 $\mu$ L PBS, Aufteilen der entstehenden Suspension in sieben neue ZentrifugengefäÙe à 100 $\mu$ L. Zugabe von 200  $\mu$ L Atrazinstandard oder 200  $\mu$ L PBS (Nullprobe). Zugabe von je 100  $\mu$ L Tracer-Verdünnung (4 $\mu$ L Tracer in 5mL PBS; entspricht einer 1:25000 Verdünnung in der Mikrotiterplatte), 1 h bei Raumtemperatur.
6. Waschen: + 20 $\mu$ L Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung, + 400 $\mu$ L Wasser dest., Zentrifugation (20min), Entnahme der überstehenden Lösung.
7. Substratreaktion: Substratlösung 9: 4mL Wasser + 0.4mL Penicillin-Stammlösung + 0.25mL Carbonat; Zugabe von 400 $\mu$ L Substrat, Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur.
8. Messen: Zugabe von je 100 $\mu$ L Chromogen-Lösung. Zentrifugation für 20min. Überführen von je zweimal 200  $\mu$ L in Kavitäten der Mikrotiterplatte. Messung bei 450nm im EIA-Reader.

Abbildung 7-21 zeigt die erhaltene Kalibrierkurve. Der erhaltene  $I_{50}$ -Wert lag bei  $9.511 \mu\text{g/L}$ .

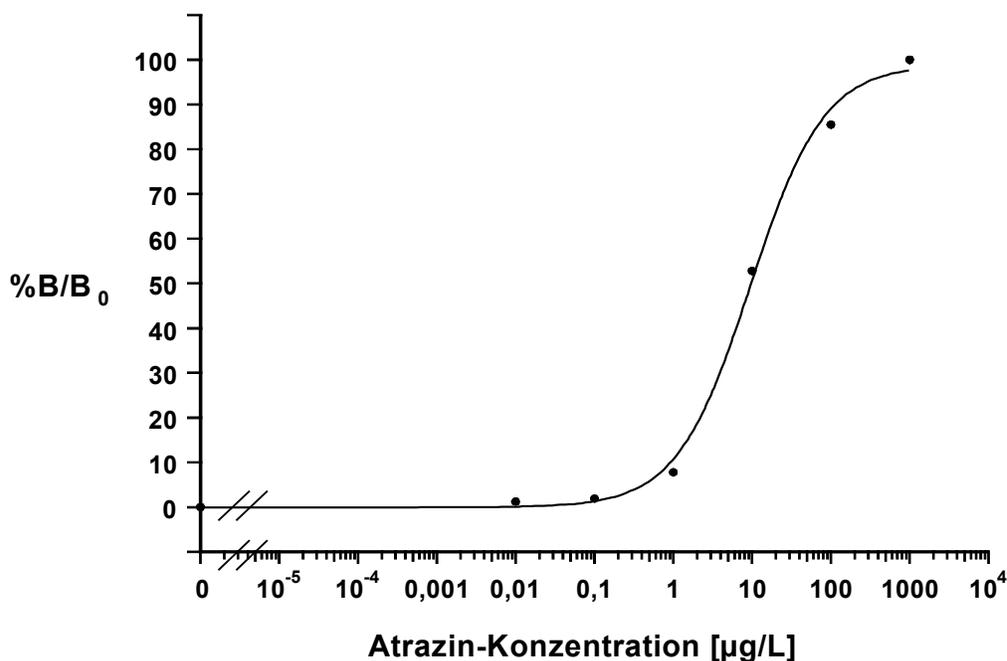


Abb. 7-21 Kalibrierkurve, erhalten aus einer  $K_4E_7$ -Verdünnung von 1:60000 und einer Tracer-Verdünnung von 1:25000 unter Verwendung von Polystyrolmikropartikeln als fester Phase im Immunassay.

In den nachfolgenden Untersuchungen wurde durch Variation der Tracer und Antikörper-Verdünnung versucht, einen besseren Testmittelpunkt zu erreichen. Außerdem konnte nach Anschaffung einer anderen Zentrifuge mit höherer Leistung zwischen den einzelnen Inkubationsschritten öfters gewaschen werden. So konnte die Gefahr einer Verschleppung von Lösungen von einem Schritt zum anderen verringert werden. Die Zentrifugationszeit verkürzte sich auf 8min bei einer Umdrehungszahl von 11000rpm, dies entspricht 12900G. Eine höhere Umdrehungszahl konnte nicht verwendet werden, da es dann zur irreversiblen Verklumpung der Mikropartikel kam.

Die folgenden Untersuchungen wurden mit nachstehendem Schema durchgeführt:

1. Vorcoaten: 2x 20µL PSMP + 3.8µL Ziege-anti-Maus + 800µL Carbonat, über Nacht bei 4°C.
2. Waschen: 20µL Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (8min), Entnahme der überstehenden Lösung, 2x + 800µL PBST, Zentrifugation (8min), Entnahme der überstehenden Lösung.
3. Immunreaktion: 2x + 400µL PBS, Vereinigen der Suspensionen, Zugabe von verschiedenen Volumina einer 1:100 K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnung, 3h bei Raumtemperatur.
4. Waschen: + 20µL Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (8min), Entnahme der überstehenden Lösung, 2x + 800µL PBST, Zentrifugation (8min), Entnahme der überstehenden Lösung.
5. Konkurrenz: Zugabe von 800µL PBS, Aufteilen der entstehenden Suspension in sieben neue Zentrifugengefäße à 100µL. Zugabe von 200 µL Atrazinstandard oder 200 µL PBS (Nullprobe). Zugabe von je 100 µL Tracer-Verdünnung, 1 h bei Raumtemperatur.
6. Waschen: + 20µL Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (8min), Entnahme der überstehenden Lösung, 2x + 400µL Wasser dest. + Tween 20 (10ml Wasser + 5µl Tween 20), Zentrifugation (8min), Entnahme der überstehenden Lösung.
7. Substratreaktion: Substratlösung 9; Zugabe von 400µL Substrat, Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur.
8. Messen: Zugabe von je 100µL Chromogen-Lösung. Zentrifugation für 10 min. Überführen von je zweimal 200 µL in Kavitäten der Mikrotiterplatte. Messung bei 450nm im EIA-Reader.

In den folgenden Tabellen 7-17 und 7-18 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst:

I <sub>50</sub> [µg/L]	20%B/B <sub>0</sub> [µg/L]	80%B/B <sub>0</sub> [µg/L]	Korrelation
1.122	0.303	5.345	0.997
1.113	0.309	4.650	0.999
1.224	0.307	4.765	0.993
1.087	0.244	5.320	0.997
MW = 1.137µg/L s = 0.060 VK = 5.29%	MW = 0.291µg/L s = 0.031 VK = 10.75%	MW = 5.020µg/L s = 0.364 VK = 7.25%	

Tab. 7-17 Erhaltene Ergebnisse mit einer Tracer-Verdünnung von 1:32000 und einer K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnung von 1:60000. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Kalibrierkurven.

I <sub>50</sub> [µg/L]	20%B/B <sub>0</sub> [µg/L]	80%B/B <sub>0</sub> [µg/L]	Korrelation
0.963	0.108	8.281	0.999
0.986	0.181	6.831	0.992
1.113	0.197	7.831	0.999
0.942	0.123	7.511	0.995
MW = 1.001µg/L s = 0.077 VK = 7.67%	MW = 0.152µg/L s = 0.043 VK = 28.48%	MW = 7.614µg/L s = 0.610 VK = 8.00%	

Tab. 7-18 Erhaltene Ergebnisse mit einer Tracer-Verdünnung von 1:50000 und einer K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnung von 1:60000. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Kalibrierkurven.

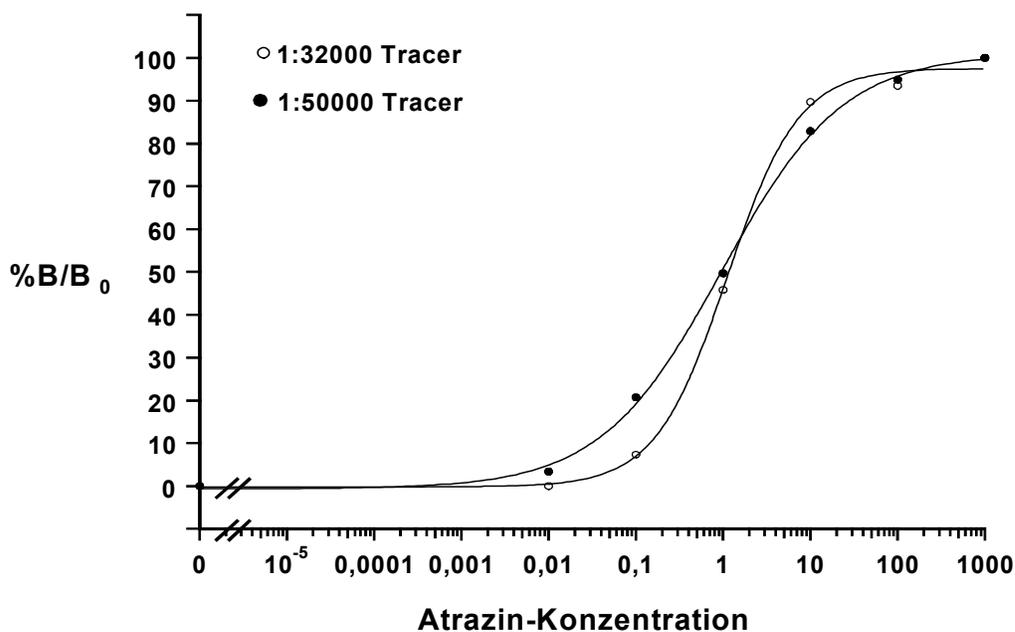


Abb. 7-22 Exemplarische Kalibrierkurven mit einer Antikörper-Verdünnung von 1:60000 und verschiedenen Tracer-Verdünnungen.

### 7.8.3. Zusammenfassung und Diskussion

Der Immunoassay in der Mikrotiterplatte konnte erfolgreich auf die Polystyrolmikropartikel übertragen werden. Es konnte erfolgreich der Antikörper auf der Oberfläche der Polystyrolmikropartikel immobilisiert werden. Mit einer Antikörper-Verdünnung von 1:60000 und einer Tracer-Verdünnung von 1:50000 konnte eine leichte Verbesserung der Testmittelpunkte erreicht werden. Die erreichten Testmittelpunkte erreichen nicht das von der Europäischen Union geforderte Limit von 0,1 μg/L für ein einzelnes Pestizid.

## 7.9 Einsatz der pH-Elektrode

### 7.9.1 Bestimmung der Atrazinkonzentration mit der pH-Elektrode

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Enzymimmunoelktrode zur Bestimmung von Pestiziden im Wasser. Deswegen wurde ein Immunoassay entwickelt, welcher ein Enzym zur Markierung verwendete, welches eine pH Änderung in einer Substratlösung hervorruft. Das verwendete Enzym ist die  $\beta$ -Lactamase. Durch die Spaltung von Penicillin G durch  $\beta$ -Lactamase wird eine Säuregruppe gebildet und damit ist eine Abnahme des pH-Wertes der Lösung verbunden.  $\beta$ -Lactamase hat eine Kinetik nullter Ordnung, das heißt, daß die Kinetik unabhängig von der Substratkonzentration ist. Werden für unterschiedliche Proben die gleichen Substratlösungen verwendet, so sollte die Abnahme des pH-Wertes der Menge an immobilisiertem Enzym entsprechen und diese wiederum der Menge an Analyt in der Lösung. Als vorbereitende Untersuchung wurde die Stabilität des Meßwertes der pH-Elektrode überprüft. Dafür wurde über längere Zeit das Meßsignal einer KCl-Lösung aufgezeichnet. Abbildung 7-23 zeigt das erhaltene Ergebnis.

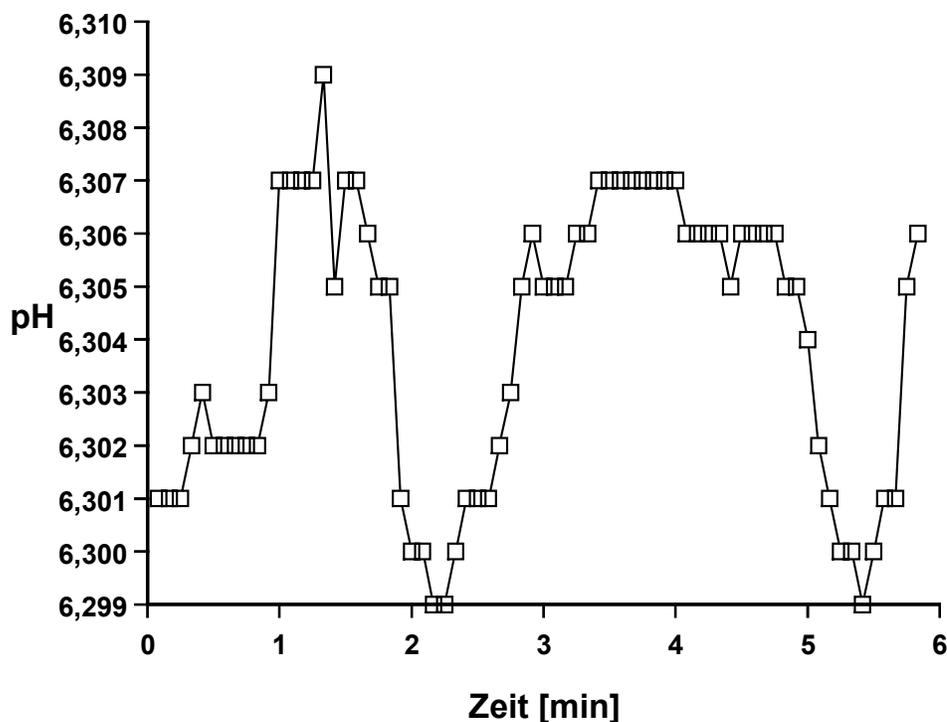


Abb. 7-23 Stabilität der Meßwerte einer 3M KCl-Lösung, Kurve aus Gründen der Anschaulichkeit.

Die Kurve zeigt eine Variation von  $\pm 0.005$  pH-Einheiten. Man kann von einem stabilen Signal ab der zweiten Nachkommastelle ausgehen.

Es wurde zuerst eine pH-Elektrode mit einer flachen Membran verwendet, da die beschichteten Polystyrolmikropartikel mit einer Dialysemembran in der Nähe der Glasmembran fixiert werden sollten. Durch die Dialysemembran konnte aber kein stabiles Signal erhalten werden. Ein weiterer Grund auf diese Elektrode zu verzichten, war derjenige, daß die Elektrode mit Gelelektrolyt gefüllt war. Durch den Gelelektrolyt ist der Ausfluß an Innenpuffer sehr gering und die Gefahr einer Kontamination durch in der Meßlösung vorhandene Substanzen vergrößert sich damit. Da die Gefahr einer Kontamination durch die Substratlösung sehr groß war, konnte auch daran gesehen werden, daß Penicillin G in die Elektrode durch das Diaphragma eindiffundierte und schwerlösliche Silbersulfide bildete. Die Elektrode konnte nicht mehr verwendet werden.

Es wurde daraufhin eine handelsübliche pH-Elektrode im Flüssigelektrolyt von WTW verwendet. Die Elektrode hatte einen integrierten Temperaturfühler. Das eingesetzte pH-Meter wurde von einem Mikroprozessor gesteuert. Das pH-Meter führte eine automatische Temperaturkorrektur durch.

Es wurden nun die vorher modifizierten Polystyrolmikropartikel mittels der pH-Elektrode vermessen. Es wurde eine Substratlösung von 4mL Wasser mit 0.4mL Penicillin G-Stammlösung und 60 $\mu$ L Carbonat verwendet. Das zugegebene Volumen an Carbonat wurde reduziert, da nun die Abnahme des pH-Wertes in Abhängigkeit der Menge an immobilisiertem Enzym betrachtet werden sollte. Ein zu großes zugegebenes Volumen an Carbonat würde die Reaktion zu stark abpuffern und damit die Änderung des pH-Wertes verlangsamen. Die Steigung der erhaltenen Gerade würde abflachen und der Unterschied zwischen Null- und Überschußprobe verringert werden. Es wurden Meßwerte in einem Intervall von 5 Sekunden aufgenommen. Die Auswertung erfolgte durch eine Auftragung des pH-Wertes gegen den Meßwert. Die resultierende Gerade wurde mittels linearer Regression ausgewertet. Zuerst wurde eine Tracerverdünnung von 1:32000 und eine Antikörper-Verdünnung von 1:60000 vermessen. Der Immunoassay wurde nach der optimierten Methode für Polystyrolmikropartikel durchgeführt.

Tabelle 7-19 zeigt die erhaltenen Steigungen.

Atrazin-Konzentration [ $\mu\text{g/L}$ ]	Steigung
0	-0,002718
0.001	-0,002749
0.01	-0,002880
0.1	-0,002573
1	-0,002708
10	-0,002702
100	-0,002616
1000	-0,002388

Tab. 7-19 Steigungen erhalten mit einem Immunoassay unter Verwendung von einer Tracer-Verdünnung von 1:32000 und einer Antikörper-Verdünnung von 1:60000. Die Messung erfolgte mit der pH-Elektrode.

Es ist ein Abnahme der Steigung erst bei einer Atrazin-Konzentration von 1000 $\mu\text{g/L}$  zu verzeichnen. Deswegen wurde die Tracer-Verdünnung erhöht.

Tabelle 7-20 zeigt die erhaltenen Ergebnisse für eine Tracer-Verdünnung von 1:10000.

Atrazin-Konzentration [ $\mu\text{g/L}$ ]	Steigung
0	-0,003510
0.01	-0,002953
0.1	-0,002704
1	-0,002226
10	-0,001967
100	-0,002015
1000	-0,002071

Tab. 7-20 Steigungen erhalten mit einem Immunoassay unter Verwendung von einer Tracer-Verdünnung von 1:100000 und einer Antikörper-Verdünnung von 1:60000. Die Messung erfolgte mit der pH-Elektrode.

Es ist nun eine kontinuierliche Verringerung der Steigung gefunden worden.

Es wurden nun verschiedene Immunoassays nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Vorcoaten: 2x 20 $\mu\text{L}$  PSMP + 3.8 $\mu\text{L}$  Ziege-anti-Maus + 800 $\mu\text{L}$  Carbonat, über Nacht bei 4°C.
2. Waschen: + 20 $\mu\text{L}$  Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (8min), Entnahme der überstehenden Lösung, 2x + 800 $\mu\text{L}$  PBST, Zentrifugation (8min), Entnahme der überstehenden Lösung.
3. Immunreaktion: 2x + 400 $\mu\text{L}$  PBS, Vereinigen der Suspensionen, Zugabe von verschiedenen Volumina einer 1:100  $\text{K}_4\text{E}_7$ -Verdünnung, 3h bei Raumtemperatur
4. Waschen: + 20 $\mu\text{L}$  Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (8min), Entnahme der überstehenden Lösung, 2x + 800 $\mu\text{L}$  PBST, Zentrifugation (8min), Entnahme der überstehenden Lösung.

5. **Kompetition:** Zugabe von 800µL PBS, Aufteilen der entstehenden Suspension in sieben neue Zentrifugengefäße à 100µL. Zugabe von 200 µL Atrazinstandard oder 200 µL PBS (Nullprobe). Zugabe von je 100 µL Tracer-Verdünnung, 1 h bei Raumtemperatur.
6. **Waschen:** + 20µL Tween 20 Verdünnung, Zentrifugation (8min), Entnahme der überstehenden Lösung, 2x + 400µL Wasser dest. + 20µL Tween 20 (10ml Wasser + 5µl Tween 20), Zentrifugation (8min), Entnahme der überstehenden Lösung.
7. **Aufbewahrung:** Die beschichteten PSMP wurden in 400µL Aufbewahrungslösung aufgeschlämmt und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.
8. **Substratreaktion:** Substratlösung 9, 4mL + 200µL der beschichteten PSMP; Kinetik wurde mit der pH-Elektrode gemessen.

Tabelle 7-21 zeigt die Ergebnisse die mit einer Tracer-Verdünnung von 1:100000 und einer Antikörper-Verdünnung von 1:60000 erhalten wurde.

$I_{50}$ [µg/L]	20%B/B <sub>0</sub> [µg/L]	80%B/B <sub>0</sub> [µg/L]	Korrelation
0.066	0.001	7.585	0.997
0.070	0.029	0.140	0.998
0.069	0.006	0.521	0.990

Tab. 7-21 Ergebnisse erhalten aus der Messung des Immunoassays mit der pH-Elektrode. Tracerverdünnung 1:100000, Antikörper 1:60000. Ergebnisse aus drei unabhängigen Kurven.

Tabelle 7-22 zeigt die Ergebnisse die mit einer Tracer-Verdünnung von 1:100000 und einer Antikörper-Verdünnung von 1:100000 erhalten wurde.

$I_{50}$ [µg/L]	20%B/B <sub>0</sub> [µg/L]	80%B/B <sub>0</sub> [µg/L]	Korrelation
0.004	0.0008	0.052	0.988
0.005	0.0005	0.047	0.994
0.021	0.0043	0.081	0.998

Tab. 7-22 Ergebnisse erhalten aus der Messung des Immunoassays mit der pH-Elektrode. mit einer Tracer-Verdünnung von 1:100000 und einer Antikörper-Verdünnung von 1:100000. Ergebnisse aus drei unabhängigen Kurven.

Abbildung 7-24 zeigt eine exemplarische Kalibrierkurve erhalten mit einer Tracer-Verdünnung von 1:100000 und einer Antikörper-Verdünnung von 1:60000.

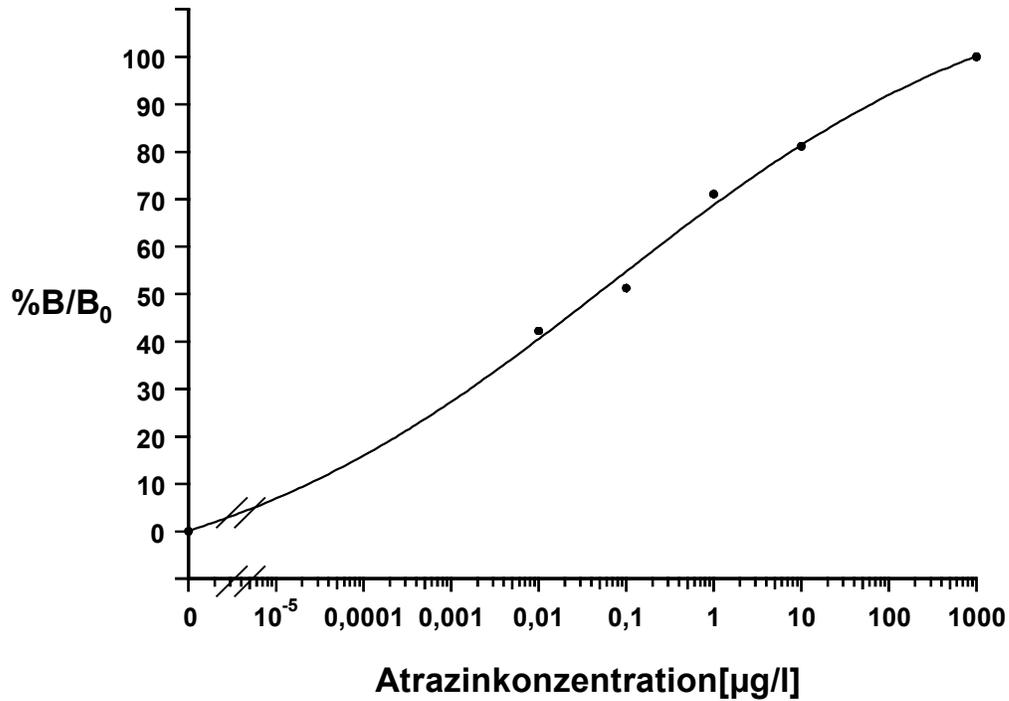


Abb. 7-24 Exemplarische Kalibrierkurve erhalten mit einer Tracer-Verdünnung von 1:100000 und einer Antikörper-Verdünnung von 1:60000.

Abbildung 7-25 zeigt eine exemplarische Kalibrierkurve erhalten mit einer Tracer-Verdünnung von 1:100000 und einer Antikörper-Verdünnung von 1:100000

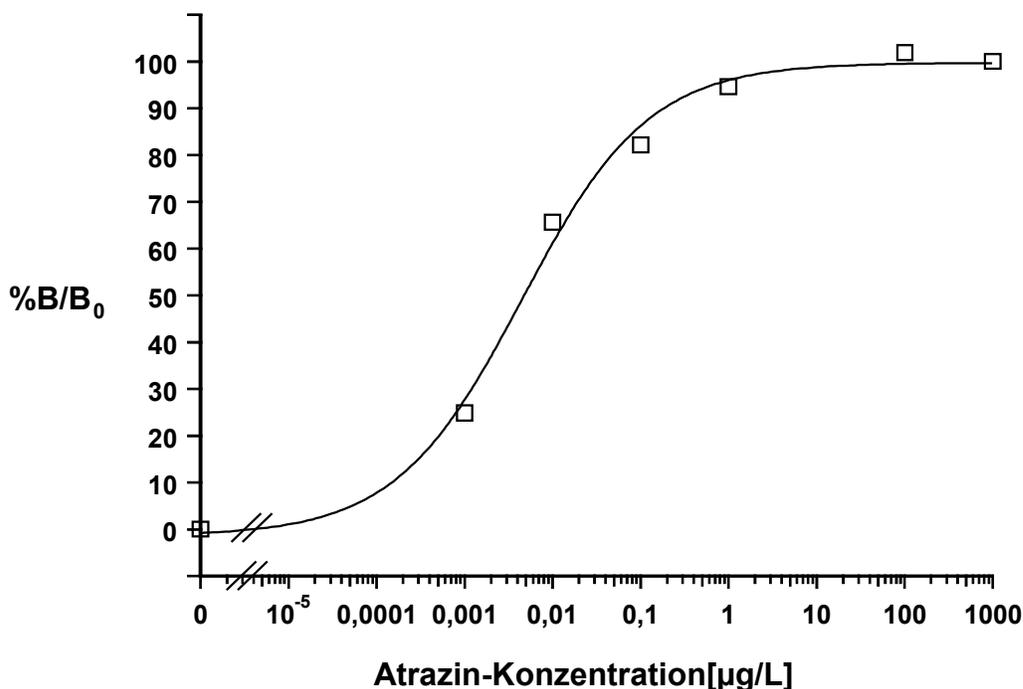


Abb. 7-25 Exemplarische Kalibrierkurve des Immunoassays mit der pH-Elektrode unter Verwendung einer Tracer-Verdünnung von 1:100000 und einer Antikörper-Verdünnung von 1:100000.

Allgemeine Bemerkungen zur Durchführung der Messungen:

Vor jeder Messung wurde die pH-Elektrode mit DIN-Puffern kalibriert.

Die Substratlösung wurde in einem Becherglas angesetzt und zu 4mL in Schnappdeckelgefäße überführt. Die einzelnen Schnappdeckelgefäße wurden mit einem Deckel verschlossen, um ein Eindiffundieren von CO<sub>2</sub> bis zur Messung zu verhindern. Bei jeder Probe wurde zunächst die Substratlösung ohne Polystyrolmikropartikel vermessen. Es wurde gewartet bis ein stabiles Signal erreicht wurde und dann 200µL der beschichteten Polystyrolmikropartikel-Lösung zugegeben. Die Messungen wurden ohne Rühren durchgeführt, da ein kontinuierliches Rühren zu keinen verwertbaren Ergebnissen führte. Um eine gute Durchmischung der Partikel mit der Substratlösung zu erreichen, wurde der Rührer kurz angeschaltet, bis sich beide Lösungen durchmischt hatten, aber die eigentliche pH-Messung erfolgte ohne Rühren.

### 7.9.2. Zusammenfassung und Diskussion

Es konnte der Immunoassay mit Polystyrolmikropartikel als fester Phase mittels einer pH-Elektrode vermessen werden. Die Tracer-Verdünnungen und Antikörper-Verdünnungen konnten noch weiter gesenkt werden. Durch die Verwendung der pH-Elektrode konnte der Testmittelpunkt um ein Vielfaches gesenkt werden. Es wird damit der Wert, der als Maximalwert von der europäischen Union angegeben wird, von 0.1 µg/L pro Pestizid weit unterschritten.

Eine weitere Schwierigkeit stellt die Ionenstärke der Meßlösung dar. Es wurden Versuche zur Erhöhung der Ionenstärke der Meßlösung durchgeführt, aber der Zusatz von Sulfat führte zu einer Drift des Meßsignals. Eine erhöhte Zugabe von Phosphat oder Carbonat puffern die Lösung zu stark ab, und der Unterschied in der Steigung der resultierenden Geraden von Null- und Überschußprobe wird zu gering.

Ist die Ionenstärke zu gering, kommt es zu einer Drift des Meßsignals, und eine Bestimmung des pH-Wertes ist nicht möglich. Außerdem verarmt die Auslaugschicht der Membran der pH-Elektrode stark an Ionen. Dadurch entstehen große Gedächtniseffekte, und die Lebensdauer der pH-Elektrode wird stark verkürzt. Es wurde versucht, durch Zugabe eines Salzes die Ionenstärke der Lösung zu erhöhen. KCl würde sich als Salz anbieten, aber KCl kann nicht zugesetzt werden, da eine zu hohe Konzentration an Chlorid-Ionen vermieden werden sollte, da in der Literatur von einer Hemmung der  $\beta$ -Lactamase durch Chlorid-Ionen berichtet wurde. Im Immunoassay konnte zwar eine Hemmung des Tracers durch Verdünnung in PBS nicht nachgewiesen werden, aber vor der Substratreaktion wurde intensiv mit Wasser gewaschen, um Reste des Puffers zu entfernen. Es ist damit davon auszugehen, daß während der Substratreaktion kein Chlorid in der Lösung vorhanden war. Andere ionische Verbindungen wie Phosphat oder Carbonat haben Puffereigenschaften und sollten nicht in erhöhtem Maße zugesetzt werden, da sonst die Abnahme des pH-Wertes aufgrund der Reaktion der Lactamase zu stark abgepuffert würde, und der Unterschied zwischen Null- und Überschußprobe zu gering ausfallen würde. Ein Zusatz von Natriumsulfat führte zu einer Abnahme des Messwertes ohne den Zusatz von Polystyrolmikropartikeln. Kalziumsalze können nicht verwendet werden, da Kalzium Penicillin G zerstört.

## 7.10 Allgemeine Fehlerbetrachtung:

In der vorliegenden Arbeit sind für verschiedene Versuchsreihen Tabellen erstellt worden und die Mittelwerte der  $I_{50}$ -Werte berechnet worden. Es resultierten öfters hohe Variationskoeffizienten, welche oft ihre Ursache in der starken Abweichung eines Wertes hatten. Zu diesen Fehlern ist folgendes zu sagen:

Die Mittelwerte sind aus unabhängigen Kurven berechnet worden, so daß die Kurven nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Diese Mittelwerte dienen lediglich einer einfachen Abschätzung, wie sich die Ergebnisse bei Änderung der Meßparameter ( $K_4E_7$ -Verdünnung, Tracer-Verdünnung, Waschschritte, Puffer, Temperatur) veränderten. Zudem gestatten sie eine Abschätzung, in wieweit der  $I_{50}$ -Wert bei nicht vermeidbarer Variation der Raumtemperatur, Einwaagefehler bei Pufferzusammensetzung zwischen den Kalibrierkurven schwanken kann. Die Kurven sind an verschiedenen Tagen erstellt worden, für jeden Tag ist neuer Puffer angesetzt worden und damit kommt es zu einem Einwaagefehler bei der Herstellung der Puffer. Durch diesen Fehler ist ein Fehler in der Ionenstärke bestimmt, der einen großen Einfluß auf die Bindungsfähigkeit des Antikörper haben kann, wie in Kapitel 7.5.1 zur Untersuchung verschiedener Verdünnungspuffer gezeigt werden konnte. Desweiteren ist der Einfluß von der Temperatur im Immunoassay sehr groß. Die Temperatur hat wahrscheinlich den größten Einfluß, da es sich bei der vorliegenden Arbeit um einen Enzymimmunoassay handelt. Es ist davon auszugehen, daß die Enzymreaktion im Sommer schneller vonstatten geht als im Winter, da es bei der Enzymreaktion der Lactamase bei erhöhten Temperaturen von 30°C zu einer Verschnellerung der Reaktion kommt. Es kommt zu stärkeren jahreszeitlichen Schwankungen, da nicht die Möglichkeit bestand, in einem temperierten Raum zu arbeiten. Die Meßwerte, die in den Kurven aufgetragen sind, ergeben sich aus dreifach Bestimmungen der einzelnen Konzentrationen. Die Fehler, die mit diesen dreifach Bestimmungen verbunden waren, betragen 2-5%. Folgende Abbildung 7-26 zeigt eine exemplarische Kurve, die mit dem iPr/Cl/C6-Tracer erhalten wurde. In der nachfolgenden Tabelle 7-23 sind die einzelnen Absorptionswerte mit ihrem Mittelwert und dem daraus resultierenden Fehler aufgezeigt.

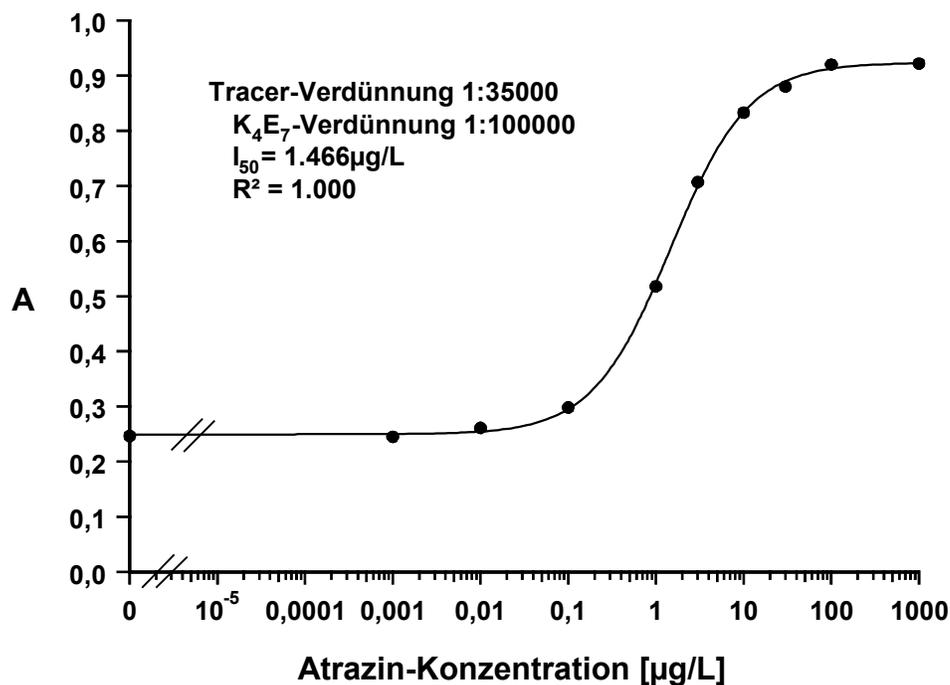


Abb. 7-26 Exemplarische Kalibrierkurve, erhalten aus den Absorptionwerten, unter Verwendung der 4-Parameter Gleichung nach Rodbard.

Atrazin-Konzentration [µg/L]	0	0.001	0.01	0.1	1	3	10	30	100	1000
Absorption	0,233	0,245	0,261	0,298	0,518	0,707	0,833	0,880	0,920	0,922
	0,239	0,243	0,272	0,310	0,502	0,669	0,808	0,861	0,917	0,900
	0,239	0,235	0,257	0,295	0,505	0,653	0,767	0,851	0,876	0,903
Mittelwert	0.237	0.241	0.263	0.301	0.508	0.676	0.803	0.864	0.904	0.908
Standardabweichung [10 <sup>-3</sup> ]	3.464	5.292	7.767	7.937	8.505	27.737	33.322	14.731	24.583	11.930
Variationskoeffizient	1.46%	2.20%	2.95%	2.64%	4.31%	4.10%	4.15%	1.71%	2.72%	1.31%

Tab. 7-23 Übersicht über die Absorptionen, die bei der Messung einer Kalibrierkurve erhalten worden sind. Weiterhin dargestellt sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten der Absorptionen.

Aus dieser Aufstellung ist zu sehen, daß die Fehler in einer Kurve sehr gering sind. Wird nun eine Probe vermessen, so wird auf der Platte, in der die Probe sich befindet, auch die Kalibrierkurve vermessen. Damit spielen die Fehler, die aus unterschiedlichen Temperaturen und unterschiedlichen Pufferzusammensetzungen keine Rolle mehr.

## 8. Diskussion der Ergebnisse

In den letzten Jahrzehnten ist die Forschung und Entwicklung im Bereich der Biosensoren immer weiter vorangeschritten. Ein Grund dafür ist die vielfältige Auswahlmöglichkeit der biologischen Komponente und Signalwandler, was zu vielfältigen Kombinationen führt und ein weites Feld an Einsatzmöglichkeiten eröffnet. Die meisten Anwendungen liegen bisher im medizinischen Bereich, aber auch im Gebiet der Lebensmittelanalytik oder Umweltanalytik sind in den letzten Jahren zahlreiche Biosensorsysteme entwickelt worden. Ein Spezialfall der Biosensoren sind die Immunosensoren, welche als biologische Komponente die hohe Selektivität und Affinität eines Antikörpers zu seinem Analyten ausnutzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neues Biosensorsystem zur Detektion von Atrazin in Wasser ausgearbeitet. Es wurde eine Enzymimmunoelktrode entwickelt, die als Signalwandler eine pH-Elektrode verwendet. Als Enzym wurde die  $\beta$ -Lactamase ausgewählt.

Die Vorgehensweise bei der Entwicklung dieses Systems war die folgende:

1. Entwicklung des Immunoassays in Mikrotiterplatten
2. Übertragung des Systems auf Polystyrolmikropartikel
3. Einsatz der pH-Elektrode als Signalwandler im Immunoassay mit Polystyrolmikropartikeln

Anhand diese Schemas werden die erhaltenen Ergebnisse kurz dargestellt und mit bereits bekannter Literatur diskutiert.

Ein Teil der erhaltenen Ergebnisse ist bereits bei den einzelnen Kapiteln diskutiert worden, wenn sie für das weitere Vorgehen von Wichtigkeit gewesen sind. Diese Ergebnisse werden noch einmal kurz wiederholt und im Gesamtkontext diskutiert. Am Ende der Diskussion soll ein Ausblick auf weitere Experimente gegeben werden.

### 8.1 Entwicklung des Immunoassays in Mikrotiterplatten

#### 8.1.1 Kinetische Untersuchungen unter Verwendung des Enzyms $\beta$ -Lactamase:

Das in dieser Arbeit verwendete Enzym  $\beta$ -Lactamase katalysiert die Spaltung von Penicillin G zu Penicillinsäure unter Ausbildung einer neuen Säuregruppe [156]. Dieses Enzym wird hauptsächlich zur Bestimmung von Penicillin-Konzentrationen verwendet [194]. Ein Einsatz als Enzymlabel in ELISA Systemen bezog sich hauptsächlich auf den medizinischen Bereich

[166,168,169]. Dort wird sehr häufig  $\beta$ -Lactamase in verschiedenen Biosensoren zur Bestimmung von Penicillin eingesetzt [171,172].  $\beta$ -Lactamase ist bis jetzt noch nicht als Enzymlabel in einem Immunoassay zur Bestimmung von Umweltschadstoffen mittels einer Änderung im pH-Wert der Substrat-Lösung zum Einsatz gekommen.

Die Verwendung von  $\beta$ -Lactamase hat einige entscheidende Vorteile:

1. Das Enzym enthält 28 Lysin-Reste, über die Moleküle mit einer Carboxyl-Funktion gekoppelt werden können.
2. Das Enzym ist in hochverdünnten Lösungen stabil, und die Stabilität kann sich durch Konjugation erhöhen[166].
3. Das Enzym toleriert pH-Werte von 5-9 ohne Verlust der Aktivität[166].
4. Die Enzymreaktion kann leicht mittels eines pH-Meters oder mit pH-sensitiven Farbstoffen verfolgt werden.

Die erste Aufgabe, die gelöst werden mußte, war die Auswahl eines geeigneten Systems zur Verfolgung der pH-Änderung. Als Endziel sollte die Messung mittels eines konventionellen pH-Meters stehen, aber für die Entwicklung des Immunoassays in der Mikrotiterplatte muß eine photometrische Detektion erfolgen. Es konnten aufgrund der apparativen Limitierung nur pH-sensitive Farbstoffe eingesetzt werden, welche eine Absorptionsbande bei 340nm, 405nm, 450nm, 490nm oder 630nm besitzen. In Kapitel 4.2.8 ist der verwendete Farbstoff HPTS kurz vorgestellt worden. Er vereinigt alle gewünschten Eigenschaften und wurde deshalb für die Entwicklung des ELISA-Systems in der Mikrotiterplatte ausgesucht. Der ausgewählte Farbstoff besitzt sein Maximum der Absorption bei 450nm im alkalischen pH-Bereich. Bei sauren pH-Werten erfolgt eine Entfärbung der Lösung. Diese Eigenschaft muß bei den nachfolgenden Untersuchungen zur Kinetik beachtet werden, da hier eine möglichst schnelle Entfärbung der Lösung auf hohe Enzymaktivität schließen läßt.

Um eine erste Abschätzung der einsetzbaren Penicillin G Konzentrationen zu bekommen, wurden kinetische Untersuchungen durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Penicillin G Konzentrationen mit gleichbleibendem Carbonat- und HPTS-Zusatz im Kinetik-Modus des EIA-Readers vermessen. Bei 0.02M und 0.01M Penicillin G ist die Entfärbung der Lösung nach 2 Minuten vollständig. Bei einer Konzentration von 0.002M Penicillin G werden 4 Minuten bis zur Entfärbung der Lösung benötigt und bei 0.001M Penicillin G dauert es 7 Minuten bis zu vollständigen Entfärbung der Lösung. Niedrigere Konzentrationen führen nach einem Abfall der Absorption zu einem Wiederanstieg der Absorptionwerte der Lösung, da die Pufferwirkung der Substratlösung nicht mehr durch Produktion von  $H^+$ -Ionen zurückgedrängt werden kann.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde eine Penicillin G Konzentration von 0.02M für die Substratlösungen im Immunoassay ausgewählt.

### 8.1.2 Synthese der Tracer unter Verwendung von $\beta$ -Lactamase

In der vorliegenden Arbeit konnte  $\beta$ -Lactamase erfolgreich zur Kopplung verschiedener Atrazin-Derivate verwendet werden. Alle hergestellten Tracer konnten die Bindung des Analyten an den Antikörper in Abhängigkeit der Konzentration des Analyten unterbinden. Es wurden Tracer mit den Haptenen iPr/Cl/C6, Di-Chloratrazin und Di-Chlorsimazin hergestellt. Die Testmittelpunkte betragen für den iPr/Cl/C6-Tracer 1.22 $\mu$ g/L, für den Di-Chloratrazin-Tracer 0.27 $\mu$ g/L und für den Di-Chlorsimazin-Tracer 0.12 $\mu$ g/L.

Die Auswahl des Haptens hat einen entscheidenden Einfluß auf die Lage des Testmittelpunktes [59-66]. Bei der Kopplung des iPr/Cl/C6 Derivates erwiesen sich die große Zahl von 28 Lysin-Reste als nicht vorteilhaft. Wie schon von anderen Arbeitsgruppen gezeigt worden ist, hat das Derivat iPr/Cl/C6 eine hohe Affinität zu  $K_4E_7$  [178]. Durch die vielen Lysin-Reste ist weiterhin davon auszugehen, daß auch viele iPr/Cl/C6-Moleküle am Enzym gebunden werden. Dadurch hat der Tracer einen Vorteil bei der Bindung an den Antikörper, da er viele potentielle Bindungsstellen für den Antikörper präsentiert, die zudem eine höhere Affinität zum Antikörper besitzen als der eigentliche Analyt. Durch die Verwendung von anderen Atrazin-Derivaten mit geringerer Affinität zum Antikörper konnte dieser Nachteil wieder ausgeglichen werden. Es ist davon auszugehen, daß das Di-Chloratrazin eine höhere Affinität zum Antikörper besitzt als das Di-Chlorsimazin, da bei dem Di-Chloratrazin es sich um eine Verkürzung der Spacerlänge handelt, währenddessen bei dem Di-Chlorsimazin außer der Verkürzung der Spacerlänge auch noch die Isopropylgruppe durch eine Ethylgruppe substituiert wurde. Bei Eremin [195] wurde postuliert, daß eine Verkürzung der Spacerlänge einen positiven Einfluß auf den Testmittelpunkt haben soll. Nach [61] ist eine höhere Affinität bei höher verzweigten Gruppen gefunden worden, z-B ein Isopropylrest erhöht damit die Affinität des Tracers zum Antikörper bei der Verwendung Triazin-spezifischer Antikörper. Damit sollte der Di-Chlorsimazin-Tracer den besten Testmittelpunkt liefern. Diese Vermutung wurde in dieser Arbeit experimentell bestätigt.

Die Verwendung des Di-Chlorsimazin-Tracers lieferte einen Testmittelpunkt von 0.12 $\mu$ g/L. Dieses Ergebnis steht in gutem Einklang mit anderen ELISA-Systemen mit Antikörperimmobilisierung, die mit diesem Antikörper entwickelt worden sind. Giersch [47] berichtet von einem Testmittelpunkt von 0.10 $\mu$ g/L in einem ELISA mit Antikörperimmobilisierung unter Verwendung eines iPr/Cl/C6-Tracers gekoppelt mit Peroxidase. Pfeifer-Fukumura et al. [67] berichtet von einem Testmittelpunkt von 0.12 $\mu$ g/L, ebenfalls in einem ELISA mit Antikörperimmobilisierung unter Verwendung eines iPr/Cl/C6-Tracers gekoppelt mit Peroxidase.

Holthues [68] berichtet von einem ELISA mit Haptenimmobilisierung mit einem Testmittelpunkt von 0.12µg/L unter Verwendung des Aminocaprinsäureatrazin-Derivates mit einer Aminogruppe am Spacerende. Eine Verbesserung des Testmittelpunktes von 0.10µg/L scheint bei der Verwendung des Antikörpers K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> in einem ELISA mit Antikörperimmobilisierung oder Antigenimmobilisierung, auch unter Verwendung anderer Tracer nicht möglich zu sein. Eine Substitution des Chloratoms sollte nicht durchgeführt werden, da dann der Tracer eine zu geringe Affinität zum Antikörper besitzt und nicht mehr erkannt wird [61,68].

Die von Khatkhatay und Desai [166] postulierte Stabilisierung und damit verbunden eine längere Lagerfähigkeit durch Kopplung von Haptenen an β-Lactamase konnte bei der Verwendung der Di-Chlorderivate nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu dem iPr/Cl/C6-Derivat, welches 2 Jahre ohne Verlust an Aktivität eingesetzt werden konnte, waren die Di-Chlor-Derivate nur einige Wochen verwendbar. Für die Übertragung des Immunoassays von der Mikrotiterplatte auf die Polystyrolmikropartikel ist es von Vorteil, eine längere Haltbarkeit des Tracers zu haben, da sonst nach der Herstellung eines neuen Tracer-Derivates eine Überprüfung der Eigenschaften durchgeführt werden muß und unter Umständen die bereits optimierten Bedingungen wieder neu angepaßt werden müssen. Deswegen wurde auf die Verwendung der Di-Chlor-Derivate verzichtet, obwohl diese den besseren Testmittelpunkt ergaben.

Es wurden Untersuchungen zum Einfluß von Huminsäuren auf den Immunoassay durchgeführt. Gerade im Hinblick auf den Einsatz des Systems zur Vermessung realer Proben muß abgeklärt werden, wie sich eventuell in der Probe befindliche Matrixbestandteile auf den Immunassay auswirken. In realen Proben kann der Huminstoffanteil beträchtlich sein [182]. Deswegen wurden Versuche durchgeführt, wie sich unterschiedliche Huminsäurekonzentrationen auf die Wiederfindungsraten des Atrazins auswirken. Wie schon von anderen Arbeitsgruppen gezeigt worden ist [182], führt das Vorhandensein von Huminsäure zu vorgespielten erhöhten Atrazinkonzentrationen. In dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten System konnte bei Huminsäuregehalten bis zu 1mg/L keine Beeinflussung der Wiederfindungsraten gefunden werden.

Generell ist zu sagen, daß monoklonale Antikörper meistens sensitiver auf Huminstoffe in der Probe reagieren als polyklonale Antikörper [182]. Dies hat seinen Grund darin, daß der monoklonale Antikörper nur aus einem immer gleichen Antikörper besteht, währenddessen der polyklonale Antikörper sich aus verschiedenen Antikörper zusammensetzt, die unterschiedliche Eigenschaften haben.

Es ist ein monoklonaler Antikörper beschrieben worden, der eine sehr hohe Toleranz gegenüber Huminstoffen besitzt [107]. Es ist ein Antikörper gegen Terbutylazin, und dieser toleriert Huminstoffkonzentrationen bis zu 26mg/L.

### 8.1.3 Untersuchung zur Kinetik der Enzymreaktion während der Kopplung der Haptene

Um einen Einfluß der Kopplung der Haptene mit dem Enzym auf die Enzymreaktion zu testen, wurden kinetische Untersuchungen während der Kopplungsreaktion durchgeführt. Betrachtet man die erhaltenen Kurven, so kann man feststellen, daß nach längerer Kopplungszeit die Kurven einen wesentlich stabileren Verlauf nehmen. So ist zu sehen, daß nach 1h Kopplungszeit eine Entfärbung der Lösung nach 3 Minuten bei 0.02M Penicillin G erfolgt war. Nach Kopplung über Nacht war eine vollständige Entfärbung nach 2 Minuten bei 0.02M Penicillin G erreicht. Die Kurvenform hatte nach der Kopplung über Nacht fast die gleiche Form wie die kinetischen Untersuchungen des nicht modifizierten Enzyms bei 0.02 M Penicillin G. Bei Konzentrationen von 0.0002M und 0.0001M Penicillin G wird das gleiche Phänomen beobachtet, daß es nach einem Abfall der Absorption zu deren Wiederanstieg kommt.

## 8.2 Übertragung des Immunoassays auf die Polystyrolmikropartikel

In der Literatur wird von vielen Immunoassay berichtet, die magnetische Mikropartikel als feste Phase verwenden [183-187]. Ein Immunoassay ist bekannt, der eine Polystyrolperle ( $\varnothing=6.4\text{mm}$ ) als feste Phase verwendete [191]. Es ist aber noch kein Immunoassay entwickelt worden, der unmodifizierte Polystyrolmikropartikel einsetzt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Polystyrolmikropartikel hatten einen Durchmesser von  $1\mu\text{m}$ .

Die Übertragung des in der Mikrotiterplatte entwickelten Immunoassays erforderte viele Vorversuche, welche in dem Kapitel 7.8.2 aufgeführt sind. Als erster Schritt mußte geklärt werden, ob eine generelle Einsetzbarkeit der Polystyrolmikropartikel möglich ist. Es wurden Versuche zur Zentrifugation der Polystyrolmikropartikel in verschiedenen Puffern und in Wasser durchgeführt. Der Empfehlung von Polyscience Inc. keine Detergenzien zu verwenden, wurde nicht gefolgt, da ein Waschen mit Detergenzzusatz einen positiven Einfluß auf das Ergebnis des Immunoassays hat. Polyscience Inc. riet von einem Zusatz von Detergenzien ab, da es in einigen Fällen zur Verklumpung der Polystyrolmikropartikel kam [192]. Wie bei der Optimierung des Immunoassays auf Mikrotiterplatten gezeigt worden ist, führt ein Waschen mit PBST zu größeren Unterschieden in der Absorption der Null- und Überschußprobe. Auch in der Literatur ist ein Zusatz von Detergenzien zum Waschpuffer empfohlen worden, da dieser Zusatz zu einer besseren Reproduzierbarkeit im Immunoassays führte [196]. In der vorliegenden Arbeit konnte

der Immunoassay auf Polystyrolmikropartikeln unter Verwendung von Detergenzhaltigen Waschpuffer PBST durchgeführt werden, ohne daß eine Verklumpung der Mikropartikel auftrat. Oft werden Antikörper über Kopplungsreagenzien an der Oberfläche immobilisiert. Als Kopplungsreagenz kommt z.B. Glutaraldehyd in Frage [45]. Weitere Vorversuche zeigten, daß eine adsorptive Kopplung der Antikörper an die Polystyroloberfläche ohne vorherige Behandlung möglich ist. Der Ziege-anti-Maus Antikörper dient dazu, die Polystyroloberfläche für die Immobilisierung des monoklonalen Antikörpers vorzubereiten. Ohne eine vorherige Beschichtung mit Ziege-anti-Maus Antikörper ist die Adsorption von monoklonalen Antikörpern an Polystyroloberflächen nur gering [65,47]. Andere Proteine können auch eingesetzt werden. Oft kommen Protein A oder BSA zur Vorbeschichtung zum Einsatz [45,198]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Immobilisierung des atrazinspezifischen Antikörpers unter der Verwendung von Ziege-anti-Maus Antikörpern durchgeführt, da diese Immobilisierungsmethode seit langem erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe verwendet worden ist.

Aufgrund der Verwendung der Polystyromikropartikel muß nun die Substratlösung auf die veränderten Bedingungen eingestellt werden. Mit der Verwendung der Polystyrolmikropartikel ist eine Oberflächenvergrößerung verbunden. Das heißt, daß im Vergleich zu der Mikrotiterplatte jetzt in 400µL Substratlösung mehr Enzym vorhanden ist. Verwendet man für einen Assay 40 µL PSMP-Suspension, so entspricht dies einer Oberfläche im Immunoassay von 37 Kavitäten. Werden insgesamt 7 Standardlösungen vermessen, so teilen sich diese 37 Kavitäten zu 5.3 Kavitäten pro Standard auf. Die einzelnen Standards wurden mit 400 µL Substratlösung zur Reaktion gebracht. In der Mikrotiterplatte wird pro Kavität 200µL Substratlösung zugegeben, d.h. 5.3 Kavitäten haben ein Volumen von 1.06mL zur Verfügung im Gegensatz zu 400µL bei Verwendung der Polystyrolmikropartikel. Es konnte unter Verwendung von Substratlösung 9 (4mL dest. Wasser + 0.4mL Penicillin-Stammlösung + 0.25mL Carbonat-Puffer) der größte Unterschied in der Absorption zwischen der Null- und Überschußprobe erreicht werden. Diese Substratlösung ist für die Optimierung der Tracer- und Antikörper-Verdünnungen eingesetzt worden.

Im folgenden Abschnitt soll etwas näher auf die Überlegungen eingegangen werden, die bei der Übertragung des Immunoassays auf die neue feste Phase in Betracht gezogen werden müssen. Mit der Verwendung solch kleiner Partikel ist ein Oberflächenvergrößerung verbunden. Durch die vergrößerte Oberfläche ist eine Zeitverkürzung zu erwarten bei den einzelnen Immunoassayschritten, da die Komponenten des Immunoassays nicht mehr so große Distanzen zurücklegen müssen, bis ein Bindungspartner zur Verfügung steht. In der Mikrotiterplatte wurde der Kompetitionschritt für 1,5h ausgeführt, währenddessen der Kompetitionschritt unter Verwendung der Polystyrolmikropartikel nur 1h dauerte, bis ein ausreichender Unterschied in

der Absorption zwischen Null- und Überschußprobe erreicht wurde. Die Beschichtung mit Ziegenanti-Maus Antikörper der Polystyrolmikropartikel wurde in einem Volumen von insgesamt 1.6mL pro Assay durchgeführt. Die Zugabe an Antikörper betrug 7.6µL. Der Assay in der Mikrotiterplatte erforderte 25µL. Für die Beschichtung mit K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> wurden pro Assay auf Polystyrolmikropartikel 6µL einer 1:100 Verdünnung an Antikörper, entspricht einer Antikörperverdünnung von 1:60000 in der Mikrotiterplatte, zugegeben. In der Mikrotiterplatte müßte für die gleiche Verdünnung 35µL einer 1:100 Verdünnung an Antikörper verwendet werden. Durch die Verwendung der Polystyrolmikropartikel ist somit eine Reduzierung an benötigter Antikörper-Lösung zu verzeichnen. Somit kann durch die Verwendung der Mikropartikel die sehr teure Antikörperlösung eingespart werden.

Die Testmittelpunkte, die unter Verwendung der Mikrotiterplatte erzielt werden konnten waren bei einer Tracer-Verdünnung von 1:35000 und einer K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnung 1:100000 im Mittel 1.22µg/L für den iPr/Cl/C6 Tracer. Der optimierte Immunoassay unter Verwendung der Polystyrolmikropartikel lieferte bei einer Tracer-Verdünnung von 1:50000 und einer K<sub>4</sub>E<sub>7</sub>-Verdünnung von 1:60000 im Mittel Testmittelpunkte von 1.00µg/L für den iPr/Cl/C6 Tracer. Es konnte durch die Verwendung der Mikropartikel eine Verbesserung des Testmittelpunktes erreicht werden, dies hat den Grund darin, daß eine weitere Reduzierung der Tracermenge möglich war. Eine Verringerung der Tracer-Konzentration wirkt sich positiv auf die Lage des Testmittelpunktes aus. Auch schon in [197] konnte gezeigt werden, daß die Verringerung der Tracer-Konzentration einen größeren Einfluß auf die Lage des Testmittelpunktes hat, als die Verringerung der Antikörper-Konzentration.

### **8.3 Einsatz der pH-Elektrode als Signalwandler im Immunoassay mit PSMP**

Die Detektion des Atrazins sollte nun mittels der pH-Elektrode erfolgen. Diese Messung ist keine Endpunktsbestimmung, wie in den Immunoassays, sondern die Auswertung erfolgt nun über kinetische Parameter. Es wird die Abnahme des pH-Wertes in Abhängigkeit der Zeit aufgenommen. Daraus resultieren Geraden, deren Steigung von der Enzymkonzentration abhängt, und diese wiederum ist abhängig von der ursprünglichen Atrazin-Konzentration der Lösung.

Nachdem der Immunoassay erfolgreich auf Polystyrolmikropartikel übertragen worden ist, mußten jetzt die optimalen Bedingungen zu pH-Bestimmung mit der pH-Elektrode ermittelt werden. Anfangs stand die Idee, die Polystyrolmikropartikel mittels einer Dialysemembran in der Nähe der Glasmembran-Oberfläche zu fixieren. Dafür wurde eine Flachmembran-Glaselektrode mit Gelelektrolyt ausgewählt. Ein weiterer Vorteil der Flachmembranelektrode war, daß sie mit

einem Schliffdiaphragma ausgestattet war. Eine Elektrode mit Schliffdiaphragma wird empfohlen bei der Messung von pH-Werten in ionenarmen Medien [79].

Durch die Abschirmung der Glasmembran durch die Dialysemembran konnte kein stabiles Signal mehr erhalten werden. Desweiteren mußte auf die Verwendung der Flachmembranelektrode verzichtet werden, da es zu einem Eindiffundieren von Penicillin G in den Innenpuffer, aufgrund des ungenügenden Ausflusses von Innenelektrolyt, durch das Diaphragma kam. Penicillin G ist nicht unbegrenzt in Lösung haltbar, sondern es kommt zu einer Spaltung des Moleküls unter Freisetzung von Sulfid-Ionen. Durch das eingedrungene Penicillin G kam es zur Bildung von schwerlöslichem Silbersulfid. Die Problematik der Verschmutzung des Innenpuffers durch eindiffundierende Bestandteile der Meßlösung ist ein bekanntes Problem bei mit Gelelektrolyt gefüllten Elektroden [79]. Es wurde dann eine pH-Elektrode verwendet, die mit Flüssigelektrolyt (3M KCl) als Innenpuffer gefüllt war. Diese Elektrode war keine Flachmembranelektrode, sondern besaß eine Kugelmembran. Diese Elektrode hat einen stärkeren Ausfluß an Innenelektrolyt, so daß eine Kontamination der Elektrode, durch aus der Meßlösung eindiffundierende Bestandteile vermieden werden konnte. Diese Elektrode wurde für alle Kalibrierkurven verwendet.

Ein Problem bei der Messung von pH-Werten in ionenarmen Medien ist, daß die Glasmembran an Alkaliionen verarmen kann [79]. Um diesem Effekt vorzubeugen wurde nach der Aufnahme eines Meßpunktes, die Glaselektrode in 3M KCl gestellt und bis zur Einstellung des ursprünglichen pH-Wertes der KCl-Lösung vor der Messwertaufnahme abgewartet. Bis der ursprüngliche pH-Wert der KCl Lösung wieder erreicht wurde, vergingen in der Regel 10 Minuten. Der Anstieg bis auf Werte nahe des ursprünglichen pH-Wertes erfolgte rasch, aber es wurde zur Sicherheit abgewartet, bis das Meßsignal innerhalb einer Minute keine Schwankungen mehr zeigt, die größer als 0.002pH-Einheiten waren.

Die Substratlösung, die in dem Immunoassay unter Verwendung der Polystyrolmikropartikel zu Einsatz kam, wurde auch für die Messung mit der pH-Elektrode verwendet. Die Optimierung erfolgte hier über unterschiedliche Verdünnungen des Antikörpers. Der Immunoassay unter Verwendung der pH-Elektrode zeigte sehr kleine  $I_{50}$ -Werte. So wurde z.B. für eine Tracer-Verdünnung von 1:100000 und einer  $K_4E_7$ -Verdünnung von 1:100000 ein  $I_{50}$ -Wert von 0.0005 µg/L gefunden. Die von der Europäischen Union geforderten 0.1µg/L für ein einzelnes Pestizid sind bei weitem unterschritten worden. Bei einer Tracer-Verdünnung von 1:100000 und einer Antikörper-Verdünnung von 1:100000 lagen die erreichten Testmittelpunkte im ng/L Bereich. Dies ist der bis jetzt sensitivste Immunoassay für Atrazin.

In Abbildung 8-1 ist der generelle Ablauf des Immunoassays unter Verwendung von Polystyrolmikropartikeln und der pH-Elektrode aufgezeigt.

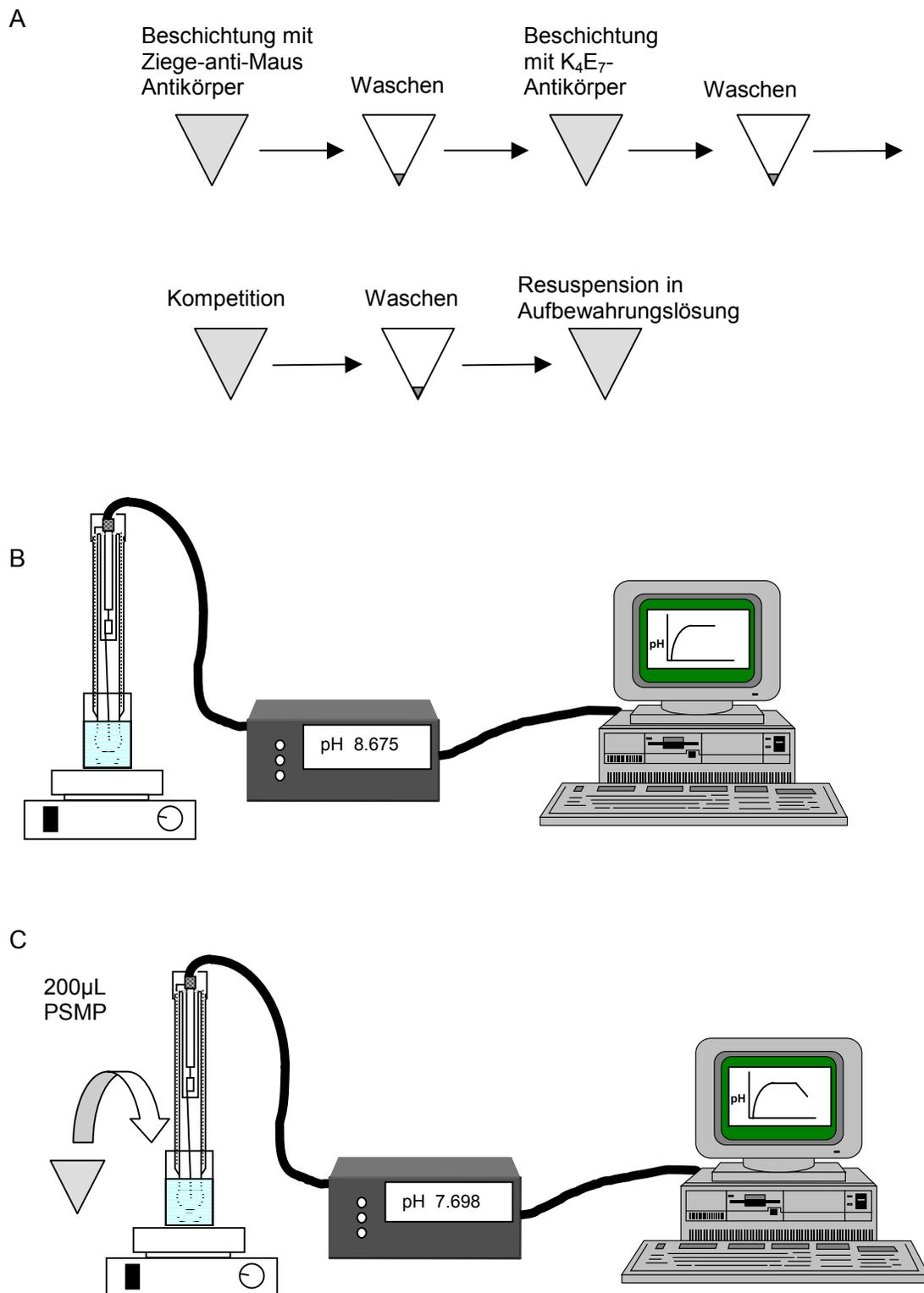


Abb. 8.1 Schematischer Ablauf der Messung mittels der pH-Elektrode, A Vorbereitung der PSMP; B Messung des pH-Wertes vor PSMP Zugabe; C Messung des pH-Wertes nach PSMP-Zugabe.

In A sind noch einmal kurz die Schritte im Immunoassay unter Verwendung der Polystyrolmikropartikel, bis zu der Resuspension in Aufbewahrungslösung dargestellt. In dieser Aufbewahrungslösung verblieben die beschichteten Polystyrolmikropartikel bis zu ihrer Vermessung mit der Elektrode. In B ist der schematische Ablauf der Messung der Substratlösung ohne Polystyromikropartikel dargestellt, bis ein konstantes Plateau erreicht worden ist. Nach Zugabe der Polystyrolmikropartikel ist in C der Ablauf der Messung dargestellt. Es wird für 10 Minuten die Änderung des pH-Wertes aufgezeichnet. Danach wird die Elektrode mit Wasser abgespült und in 3M KCl gestellt, bis der ursprüngliche pH-Wert der KCl-Lösung wieder erreicht worden ist. Danach beginnt die Messung der nächsten Lösung mit dem Teil B der Abbildung.

Im folgenden Abschnitt sollen die in der Literatur aufgeführten Biosensoren für Atrazin mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode, einmal hinsichtlich der biologischen Komponente, einmal hinsichtlich des Signalwandlers, verglichen werden.

Es sind, wie in Tabelle 5-2 dargestellt, schon verschiedene Biosensorsysteme zur Bestimmung von Atrazin in Wasser oder Bodenproben entwickelt worden. Bei den Biosensorsystemen zur Bestimmung von Atrazin sind die unterschiedlichsten biologischen Komponenten verwendet worden. In einem System wurden Algen verwendet und als Meßsignal wurde die Chlorophyll-Fluoreszenz in Abhängigkeit der Atrazin-Konzentration bestimmt. Atrazin inhibiert den Elektronentransport im Photosystem der Pflanzen und in Algen. Durch diese Inhibierung steigt die Chlorophyll-Fluoreszenz an und kann mit der Konzentration an Atrazin korreliert werden. Das Detektionslimit bei diesem System betrug  $20\mu\text{g/L}$ . Ein weiterer Biosensor unter Verwendung von Algen als biologischer Komponente erreichte ein Detektionslimit von  $5\text{nM}$ ; dies entspricht  $1.08\mu\text{g/L}$ .

Es sind verschiedene Immunosensoren zur Bestimmung von Atrazin entwickelt worden, welche die unterschiedlichsten Detektionssysteme verwendeten. So wurde ein Immunosensor unter Verwendung eines Quarzkristalls entwickelt, der ein Detektionslimit von  $0.01\mu\text{g/L}$  besaß [118]. Es werden auch verschiedene Immunosensoren beschrieben, bei denen die Atrazin-Konzentration über eine Fluoreszenz-Detektion des Tracerderivates erfolgte. Die Detektionslimits waren sehr unterschiedlich, obwohl die Systeme sehr ähnlich aufgebaut waren. Beide Systeme verwendeten Protein A zur Immobilisierung des polyklonalen Antikörpers. Der Unterschied lag in Detektion der für den Assay relevanten Komponente zur Bestimmung der Atrazin-Konzentration. In [114] wurden Probe, Tracer-POD und Antikörper zusammen in einen Protein A-Reaktor eingespritzt und nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten die Substratlösung injiziert und der entstehende Farbstoff fluorimetrisch detektiert. In diesem Fall konnte ein

Detektionslimit von  $0.007\mu\text{g/L}$  erreicht werden. Im anderen System [112] wurde Atrazin mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt und die nicht durch den Antikörper gebundene Menge in einem Durchflußsystem fluorimetrisch detektiert. In diesem Fall betrug das Detektionslimit  $0.7\mu\text{g/L}$  [112].

Molekular geprägte Polymere (MIP) sind in letzter Zeit sehr in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. So ist auch ein Sensor entwickelt worden, der MIP's als atrazinsensitives Element benutzte. Dieses System hatte aber noch ein sehr hohes Detektionslimit von  $430\mu\text{g/L}$  [119].

In Tabelle 5-2 sind noch weitere Biosensorsysteme aufgeführt. Sieht man sich die bisher erreichte Detektionslimits an, so liegt die in dieser Arbeit entwickelte Enzymimmunoelktrode noch unterhalb des Bereiches der bisher entwickelten Systeme. Es ist der bisher sensitivste Immunoassay der zu Bestimmung von Atrazin entwickelt worden ist. Es ist damit ein sehr sensitives System, zum Screening von Wasserproben auf eine Atrazinbelastung entwickelt worden.

## 9. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit ist erfolgreich eine Enzymimmunoelktrode zur Bestimmung von Atrazin in Wasser entwickelt worden. Diese Methode sollte als Screening-Methode zur Bestimmung von Atrazin in Wasser einsetzbar sein. Es müßten als nächster Schritt reale Wasserproben vermessen werden, dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich. Es könnte durch die Verwendung eines anderen Tracers die Messung mit der pH-Elektrode verbessert werden. Ein Einsatz eines solchen Tracer hätte wahrscheinlich einen größeren Unterschied in der Steigung von Null- und Überschußprobe zur Folge, da durch den Einsatz des iPr/Cl/C6-Derivates ein Hapten zum Einsatz kam, welches eine sehr große Affinität zum Antikörper hatte und damit auch in der Überschußprobe zu einem gewissen Teil gebunden ist. Dadurch wird auch ein gewisses Maß an pH-Änderung induziert. Es müßte dafür ein Tracer synthetisiert werden, der eine geringere Affinität zum Antikörper aufweist, aber eine höhere Stabilität besitzt als die Di-Chlorderivate. Man könnte ein Atrazin-Derivat mit einer Kette aus 2 Kohlenstoffatomen und einer Carboxylgruppe synthetisieren. Zur Verankerung an das Enzym würde die Carbodiimid-Methode zum Einsatz kommen, da eine Tracersynthese mittels dieser Methode in sehr stabilen Tracerderivaten resultierte.

Es müßte die Langzeitstabilität der beschichteten Polystyrolmikropartikel getestet werden. Wenn die mit atrazinsensitiven Antikörper beschichteten Mikropartikel in Lösung haltbar sind, wäre damit eine sehr große Zeitersparnis verbunden. Es müßte dann nur noch der Kompetitionschritt von 1h durchgeführt werden, danach wäre das System für die pH-Messung bereit.

Man könnte sich auch eine andere Separationsmethode als Zentrifugation überlegen. Damit könnte die Dauer des Immunoassays auf Polystyrolmikropartikel weiter verkürzt werden.

Es könnten auch unterschiedliche Antikörper zum Einsatz kommen. Indem man die Mikropartikel mit unterschiedlichen Antikörper beschichten würde, könnte man auf diese Weise ein Screening auf unterschiedliche Substanzen durchführen und ein Multianalytssystem aufbauen. Es müßten nicht nur Triazin-spezifische Antikörper zum Einsatz kommen, sondern es könnten Antikörper unterschiedlicher Spezifität verwendet werden. In [199] ist von einem Multianalytssystem berichtet worden, das unter Verwendung von drei unterschiedlichen Antikörpern die simultane Bestimmung von Carbaryl, Atrazin und Igarol ermöglichte. Je nach Aussehen der Kalibrierkurven konnte bestimmt werden, ob 1, 2 oder alle 3 Substanzen in der Probe vorhanden waren. Die Detektion erfolgte photometrisch.

Eine weitere Modifikation könnte die Verwendung eines ISFET zur pH-Bestimmung sein. Die Verwendung eines solchen ISFET könnte die Probleme beseitigen, die bei der Verwendung der pH-Elektrode in ionenarmen Medien auftreten.

## 10. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ist eine neue Enzymimmunoelktrode zur Bestimmung von Atrazin in Wasser entwickelt worden. Der konventionelle Immunoassay macht den Einsatz von hochspezialisierten Geräten und gut ausgebildetem Personal notwendig. Die Motivation war einen Immunoassay zu entwickeln, der ohne die speziellen Geräte, wie einen EIA-Reader, durchgeführt werden konnte, sondern unter Verwendung von Geräten ablaufen sollte, die in jedem Labor vorhanden sind. Um diese Aufgabe zu lösen sind grundsätzliche drei Änderungen im Immunoassay notwendig. Es muß das Detektorsystem EIA-Reader zur Meßwertaufzeichnung ersetzt werden, und damit verbunden muß die nur im EIA-Reader verwendbare feste Phase Mikrotiterplatte ausgetauscht werden. Als drittes muß der Immunoassay selbst dem nun veränderten Detektorsystem angepaßt werden, was gegebenenfalls den Einsatz eines neuen Enzyms als Enzymlabel (Tracer) notwendig macht.

Eine pH-Elektrode gehört zu der Grundausstattung eines Labors, und wurde anstelle des auf photometrischer Messung beruhenden EIA-Readers benutzt. Als Enzym, das eine pH-Änderung durch Spaltung von Penicillin G induziert, wurde  $\beta$ -Lactamase ausgewählt und zur Tracersynthese verwendet. Als Festphase wurde anstelle der Mikrotiterplatte Polystyrolmikropartikel (PSMP) verwendet. Der Einsatz von  $\beta$ -Lactamase und unmodifizierten PSMP erfolgte in der vorliegenden Arbeit erstmals bei einem Immunoassay für umweltrelevante Stoffe.

Die Entwicklung der Enzymimmunoelktrode erfolgte somit in drei Schritten: Entwicklung des Immunoassays für Atrazin unter Verwendung des Enzyms  $\beta$ -Lactamase, Übertragung des Assays auf die Festphase PSMP und Einsatz der pH-Elektrode als Detektorsystem.

Im ersten Schritt wurden unter Verwendung verschiedener Haptene unterschiedliche Tracer mit dem Enzym  $\beta$ -Lactamase hergestellt. Als Haptene wurden 2-Chlor-4-(isopropylamino)-6-[(1-carboxypent-5-yl)amino]-s-Triazin (iPr/Cl/C6), Di-Chloratrazin und Di-Chlorsimazin verwendet. Alle hergestellten Tracer konnten erfolgreich in einem kompetitiven Immunoassay eingesetzt werden. Durch unterschiedliche Affinitäten der Tracerderivate wurden unterschiedliche Testmittelpunkte im Immunoassay erreicht, (2-Chlor-4-(isopropylamino)-6-[(1-carboxypent-5-yl)amino]-s-Triazin  $I_{50} = 1.22\mu\text{g/L}$ ; Dichloratrazin  $I_{50} = 0.27\mu\text{g/L}$ ; Di-Chlorsimazin  $I_{50} = 0.12\mu\text{g/L}$ ). Aufgrund der nur mäßigen Stabilität der Tracer unter Verwendung der Di-Chlorderivate wurde auf deren Verwendung bei der Entwicklung der Immunoelktrode verzichtet. Der Tracer unter Verwendung des iPr/Cl/C6-Derivates war 2 Jahre ohne Verlust der Sensitivität verwendbar, so daß so eine wiederholte Tracersynthese und die damit verbundenen Validierungsversuche vermieden werden konnten.

Im zweiten Schritt erfolgte nach der Optimierung des Immunoassays in der Mikrotiterplatte dessen Übertragung auf PSMP unter Verwendung des iPr/Cl/C6-Tracers. Die Verwendung der PSMP hatte außer einer Verbesserung des Testmittelpunktes auf 1.00µg/L noch den Vorteil, daß die benötigten Mengen an Antikörper zur Durchführung eines Immunoassays drastisch verringert werden konnten.

Nach erfolgreicher Optimierung des Immunoassays auf PSMP wurde die pH-Elektrode als Signalwandler zur Bestimmung des Atrazins eingesetzt. Unter Verwendung der pH-Elektrode konnte der bisher niedrigste Testmittelpunkt ( $I_{50} = 0.005\mu\text{g/L}$ ) zur Bestimmung von Atrazin erreicht werden, welcher die von der Europäischen Union geforderten 0.1µg/L für ein einzelnes Pestizid bei weitem unterschritten hat. Damit ist ein einfaches System entwickelt worden, welches ein einfach handhabares Screening von Wasserproben in einem Labor ermöglicht.

## Verwendete Chemikalien und Geräte:

Anorganische Chemikalien:

Natrium-Dihydrogenphosphat p.A.	Merck
Dinatrium-Hydrogenphosphat p.A.	Merck
Natriumcarbonat p.A.	Merck
Natriumhydrogencarbonat p.A.	Merck
HCl konz. 37% p.A.	Merck
Wasserstoffperoxid p.A.	Merck
Natriumchlorid p.A.	Merck
NaOH	Roth
DIN-Pufferlösung pH 4.01 in Glasampullen	Schott
DIN-Pufferlösung pH 6.87 in Glasampullen	Schott

Organische Chemikalien:

Penicillin G Natriumsalz	Sigma
8-Hydroxy-pyren-1,3,6-trisulfonsäure Trinatriumsalz	Fluka
Ortho-Phenylendiamin	Merck
Citronensäure-Monohydrat p.A.	Sigma
Tween-20 p.A.	Serva
Atrazin	Riedel de Haen
Ethanol p.A.	Roth
N-Hydroxysuccinimid p.A.	Sigma
Dicyclohexylcarbodiimid p.A.	Sigma
Dioxan abs.	Fluka

Dialysemembran:

Dialysemembran Ausschlußgewicht 12000D, 1cm Breite (seamless Cellulose tubing)	Sigma
Dialysemembran Ausschlußgewicht 12000D, 3cm Breite (seamless Cellulose tubing)	Sigma

Verwendete Geräte:

pH Meter	WTW
pH Elektrode Sentix 81	WTW
pH-Elektrode Sentix Sur	WTW
Finnpette 40-200µl	Labsystems
Finnpette 200-1000 µl	Labsystems
Eppendorf 1-10 µl	Eppendorf
Multipette 4870	Eppendorf
Multipette plus	Eppendorf
Combitibs	Eppendorf
EIA-Reader Dynatech MR5000	Dynatech Laboratories
Microtiterplatten 96 Kavitäten	
Maxisorb	Nunc
Polystyrolmikropartikel 1µm	Polyscience Inc.
Vortex-Mischer Cuv-o-mix	Hellma
Reaktionsgefäße 1.7mL Safe Seal Tubes	Roth
Magnetrührer	Ikamag
UV/VIS Spektrometer Lambda 2	Perkin Elmer

Antikörper und Enzyme:

Zieg-anti-Maus IgG Serum  
K<sub>4</sub>E<sub>7</sub> monoklonaler Antikörper lyophilisiert 2mg

Sigma  
AK Prof. Dr. B. Hock  
Technische Universität München

β-Lactamase aus Bacillus Cereus  
Meerettich Peroxidase

Sigma  
Boehringer Mannheim

## Verwendete Puffer und Substratlösungen:

Verwendete Puffer:

Carbonatpuffer pH 9.6  
1.70g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
2.86g NaHCO<sub>3</sub>  
auf ein Liter mit Aqua dest. auffüllen

Phosphatpuffer + Natriumchlorid (PBS-Puffer):  
pH 7.6  
1.265g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O  
13.450g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O  
8.5g NaCl  
auf ein Liter mit Aqua dest. auffüllen

Phosphatpuffer (PB-Puffer):  
pH 7.6  
1.265g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O  
13.450g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O  
auf ein Liter mit Aqua dest. auffüllen

Wasch-Puffer (PBST) pH 7.6  
100mL PBS-Puffer  
0.5mL Tween-20  
900mL Aqua dest.

Citrat-Puffer: pH 5.0  
13.13g Citronensäurehydrat (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>\*H<sub>2</sub>O)  
110 ml Natronlauge  
auf 0.5 Liter mit Aqua dest. auffüllen

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung:  
50 µl 30%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 50 ml Citratpuffer

Phenylendiamin-Lösung:  
81 mg o-Phenylendiamin + 50 ml Citratpuffer

Aufbewahrungslösung der Polystyrolmikropartikel:  
4mL Aqua dest.; Aqua dest. ist mit Carbonatpuffer (0.25mL) auf pH 8.5 eingestellt.

Substratlösung für die kinetischen Untersuchungen:

Penicillin-Stammlösung:  
0.3564g Penicillin in 1mL Aqua dest. gelöst

Substratlösung K1: 0.02M Penicillin G ; 0.1mL Penicillin G Stammlösung in 4.9mL dest.Wasser + 30µL HPTS-Lösung + 75µL Carbonat-Puffer

Substratlösung K2: 0.01M Penicillin G ; 0.05mL Penicillin G Stammlösung in 4.95mL dest.Wasser + 30µL HPTS-Lösung + 75µL Carbonat-Puffer

Substratlösung K3: 0.002M Penicillin G ; 0.5mL Substratlösung K1 in 4.5mL dest.Wasser + 30µL HPTS-Lösung + 75µL Carbonat-Puffer

Substratlösung K4: 0.001M Penicillin G ; 0.5mL Substratlösung K2 in 4.5mL dest.Wasser + 30µL HPTS-Lösung + 75µL Carbonat-Puffer

Substratlösung K5: 0.0002M Penicillin G ; 0.5mL Substratlösung K3 in 4.5mL dest.Wasser + 30µL HPTS-Lösung + 75µL Carbonat-Puffer

Substratlösung K6: 0.002M Penicillin G ; 0.5mL Substratlösung K4 in 4.5mL dest.Wasser + 30µL HPTS-Lösung + 75µL Carbonat-Puffer

#### Substratlösungen für den Immunoassay:

Penicillin-Stammlösung:  
0.3564g Penicillin in 1mL Aqua dest. gelöst

Substratlösung 1:  
0.525mL Penicillin-Stammlösung in 21mL Aqua dest.; Aqua dest. ist mit Natronlauge auf pH 8 eingestellt.

Substratlösung 2:  
0.525mL Penicillin-Stammlösung in 21mL Aqua dest.; Aqua dest. ist mit Carbonatpuffer (0.3mL) auf pH 8.5 eingestellt.

Substratlösung 3:  
0.525mL Penicillin-Stammlösung in 21mL Aqua dest.; Aqua dest. ist mit PB-Puffer (0.125mL) auf pH 7.5 eingestellt.

Substratlösung 4:  
0.525mL Penicillin-Stammlösung in 21mL Aqua dest.; Aqua dest. ist mit Carbonatpuffer (0.6mL) auf pH 8.5 eingestellt.

Substratlösung 5:  
Phenylendiamin-Lösung + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung im Volumenverhältnis 2:1 gemischt

Substratlösung 6:  
50µL Penicillin-Stammlösung in 0.4mL Aqua dest.; Aqua dest. ist mit Carbonatpuffer (60µL) auf pH 8.5 eingestellt.

Substratlösung 7:  
40µL Penicillin-Stammlösung in 0.4mL Aqua dest.; Aqua dest. ist mit Carbonatpuffer (48µL) auf pH 8.0 eingestellt.

Substratlösung 8:

0.4mL Penicillin-Stammlösung in 4mL Aqua dest.; Aqua dest. ist mit Carbonatpuffer (0.48mL) auf pH 8.5 eingestellt.

Substratlösung 9:

0.4mL Penicillin-Stammlösung in 4mL Aqua dest.; Aqua dest. ist mit Carbonatpuffer (0.25mL) auf pH 8.5 eingestellt.

Chromogenstammlösung:

52.8mg 8-Hydroxy-pyren-1,3,6,-trisulfonsäure Trinatriumsalz (HPTS) in 1mL Aqua dest. gelöst

Chromogenlösung (HPTS-Lösung):

66µL Chromogenstammlösung in 11mL Aqua dest.

1. Junge, C.E.: **Transportmechanisms for Pesticides in the atmosphere**, *Pure and Applied Chemistry*, 42, 95-104, (1972).
2. Binstein, S.; Devillers, J.: **Evaluating the environmental fate of Atrazine in France**; *Chemosphere*, 32, 2441-2456, (1996).
3. Wasserwerte, <http://www.ebe-online.de/home/mmschwab/Umwelt/wasserwerte.htm>
4. Buser, H.-R.: **Atrazine and other Triazine Herbicides in Lakes and in Rain in Switzerland**, *Environmental Science Technologie*, 24, 1049-1058, (1990).
5. Thurman, E.M.; Cromwell, A.E.: **Atmospheric transport, deposition and fate of triazine herbicides and their metabolites in pristine areas at Isle Royale National Park**; *Environmental Science and Technology*, 34, 3079-3085, (2000).
6. Koester, C.J.; Clement, R.E.: **Analysis of drinking water for trace organics**; *Critical reviews in Analytical Chemistry*, 24, 263-319, (1993).
7. Lopez-Avila, V.; Hill, H.H.: **Field Analytical Chemistry**, *Analytical Chemistry*, 69, 289R-305R, (1997).
8. Clement, R.E.; Yang, P.W.; Koester, C.J.: **Environmental Analysis**; *Analytical Chemistry*, 69, 251R-287R, (1997).
9. Van Emon, J.M.; Lopez-Avila, V.: **Immunochemical Methods for Environmental Analysis**, *Analytical Chemistry*, 64, 79A-88A, (1992).
10. Van Emon, J.M.; Gerlach, C.L.: **Expanding the role of environmental immunoassay: technical capabilities, regulatory issues and communication vehicles**; *Analytica Chimica Acta*, 376, 55-59, (1998).
11. Sherry, J.P.: **Environmental Chemistry: The Immunoassay Option**; *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 23, 217-300, (1992).

12. Hennion, M-C.; Barcelo, D.: **Strength and Limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: A review**; *Analytica Chimica Acta*, 362, 3-34, (1998).
13. Nistor, C.; Emneus, J.; **Bioanalytical tools for monitoring polar pollutants**; *Waste Management*; 19, 147-170, (1999).
14. Mallat, E.; Barceló, D.; Barzen, C.; Gauglitz, G.; Abuknesha, R.: **Immunosensors for pesticide determination in natural waters**, *Trends in Analytical Chemistry*, 20, 124-132, (2001).
15. Eggins, B. : **Biosensors: An Introduction**; Wiley, 1996
16. Clarke, C.L.; Lyons, C.: **Electrode System for continuous monitoring in cardiovascular surgery**, *Annales of the New York Academy of Science*, 102, 29-45.
17. Hall, E.AH.; **Biosensoren**, Springer,1995
18. Cunningham, A. J. : **Introduction to bioanalytical Sensors**, Wiley Interscience, 1998
19. Göpel, W.; Hesse, J.; Zemel, J.N.: **Sensors a comprehensive survey**; Volume 1-7, VCH, 1991
20. Janata, J.; **Chemical Sensors**; *Analytical Chemistry*, 64, 196R-219R. (1992).
21. Alvarez-Icaza, M.; Bilitewski, U.: **Mass production of Biosensors**; *Analytical Chemistry*, 65, 525-533, (1993).
22. Tothill, I.E.: **Biosensors developments and Potential Applications in the agricultural diagnosis sector**; *Computers and Electronics in Agriculture*, 30, 205-218, (2001).
23. Rogers, K.R.; Williams, L.R.: **Biosensors for environmental Monitoring: A regulatory Perspective**; *Trends in Analytical Chemistry*, 14, 289-294, (1995).

24. Rogers, K.R.; Gerlach, C.L.: **Environmental Biosensors A Status Report**; *Environmental Science and Technology*, 30, 486-491, (1996).
25. IUPAC: **Electrochemical biosensors: Proposed definitions and classification**; *Sensors and Actuators B*, 30, 81(19xx).
26. Buck, R.; Hatfield, W.E.; Umana, M.; Bowden, E.F. (Eds): **Biosensor Technology**; Marcel Dekker Inc.; (1990).
27. Sidwell, S.; Rechnitz, G.A.: **Bananatrod – an electrochemical sensor for Dopamine**; *Biotechnological Letters*, 7, 419, (1985).
28. Janata, J.: **An Immuno-electrode**; *Journal of the American Chemical Society*, 97, 2914-2916, (1975).
29. Marco, M-P.; Gee, S.; Hammock, B.D.: **Immunochemical techniques for environmental analysis 1. Immunosensors**; *Trends in Analytical Chemistry*, 14, 341-350, (1995).
30. Killard, A.J.; Deasy, B.; O’Kennedy, R.; Smyth, M.R.: **Antibodies: Production, functions and Applications in Biosensors**; *Trends in Analytical Chemistry*, 14, 257-266, (1995).
31. Ghindilis, A.L.; Atanasov, P.; Wilkins, M.; Wilkins, E.: **Immunosensors: Electrochemical Sensing and other Engineering approaches**; *Biosensors and Bioelectronics*, 13, 113-131, (1998).
32. Gizeli, E.; Lowe, C.R.: **Immunosensors**; *Current Opinion in Biotechnology*, 7, 66-71, (1996).
33. Hock, B.: **Antibodies for immunosensors**, *Analytica Chimica Acta*, 347, 177-186, (1997).
34. D’Souza, S.F.: **Microbial Biosensors**; *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 337-353, (2001).
35. Haupt, K.; Mosbach, K.: **Molecular Imprinted Polymers and their use in biomimetic sensors**, *Chemical Reviews*, 100, 2495-2504, (2000).

36. Siemann, M.; Andersson, L.I.; Mosbach, K.: **Selective recognition of the Herbicide Atrazine by noncovalent molecular imprinted polymers**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 141-145, (1996).
37. Ramström, O.; Skudar, K.; Haines, J.; Patel, P.; Brüggemann, O.: **Food analyses using molecular imprinted polymers**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2105-2114, (2001).
38. Harvey, D. : **Modern Analytical Chemistry**, McGraw Hill, (2000).
39. Atkins, P.W. : **Physikalische Chemie**, VCH, (1988).
40. Falbe, J.; Regitz, M. (Hrsg.): **Römp: Chemie Lexikon**; 9. Auflage, Thieme, (1990).
41. Ramanathan, K.; Danielsson, B.: **Principles and applications of thermal biosensors**; *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 417-423, (2001).
42. Voet, D.; Voet, J.G.: **Biochemie**; VCH (1992).
43. Darnell, J. Lodish, H.; Baltimore, D.: **Molekulare Zellbiologie**, deGruyter (1994).
44. Diamandis, E.P.; Chritopoulos, T.K.: **Immunoassay**; Academic Press, (1996).
45. Tijssen, P.: **Practice and Theory of enzyme immunoassay**, Elsevier, (1987).
46. Marco, M.-P.; Gee, S.; Hammock, B.D.: **Immunochemical techniques for environmental analysis:II. Antibody production and immunoassay development**; *Trends in Analytical Chemistry*, 14, 415-425, (1995).
47. Giersch, T.: **A new monoclonal Antibody for the sensitive Detection of Atrazine with Immunoassay in Microtiter Plate and Dipstick Format**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1006-1011, (1993).
48. Giersch, T.; Kramer, K.: **Production and Application of Monoclonal Antibodies for the Determination of Pesticides**; in *Immunochemical Detection of Pesticides and their*

- Metabolites in the Water Cycle**, DFG Research Report; Hock, B.; Niessner, R.(Eds); 25-42, VCH Weinheim (1995).
49. Giersch, T.; **Einsatz monoklonaler Antikörper zum Nachweis von Triazinherbiziden; in Biochemische Methoden zur Schadstofffassung in Wasser**, Fachgruppe Wasserchemie in der GdCH (Hrsg.), 78-83, VCH Weinheim, (1993).
50. Price, C.; Neumann, D.J.(Eds.): **Principles and practice of immunoassay**; 2<sup>nd</sup> Edition; Macmillan Reference Ltd. (1997).
51. Dudley. R.A.; Edwards, P.; Ekins, R.P.; Finney, D.J.; McKenzie, I.G.M.; Raab, G.M.; Rodbard, D.; Rodgers, R.P.C.: **Guidelines for Immunoassay Data Processing**; *Clinical Chemistry*, 31, 1264-1271, (1985).
52. Bunch, D.S.; Rocke, D.M.; Harrison, R.O.: **Statistical Design of ELISA Protocols**; *Journal of Immunological Methods*, 132, 247-254, (1990).
53. Reizenstein, E.; Hallander, H.-O.; Blackwelder, W.C.; Kühn, I.; Ljungman, M.; Möllby, R.: **Comparison of five calculation modes for antibody ELISA Procedures using pertussi serology as a model**; *Journal of Immunological Methods*, 183, 279-290, (1995).
54. Rodbard, D.: **Statistical Quality control and Routine data processing for Radioimmunoassay and Immunoradiometric assay**; *Clinical Chemistry*, 20, 1255-1270, (1974).
55. Raab, G.M.: **Comparison of a logistic and a mass action curve for radioimmunoassay**; *Clinical Chemistry*, 29, 1757-1761, (1983).
56. Brady, J.F.: **Interpretation of immunoassay data**; ACS Symposium series 586; Immunoanalysis of Agrochemicals; 266-287, Nelson, J.O.; Karu, A.E.; Wong, R.B. (Eds.), (1995).
57. Fare, T.L.; Sandberg, R.G.; Herzog, D.P.: **Considerations in Immunoassay Calibration**; ACS Symposium series 646; Environmental Immunological Methods; 240-253; Van Emon,

- J.M.; Gerlach, C.L.; Johnson, J.C. (Eds.), (1996).
58. Krotzky, A.J.; Zeeh, B. :**Immunoassays for residue analysis of agrochemicals: Proposed guidelines for precision, standardization and quality control**; *Pure and Applied Chemistry*, 67, 2065-2088, 1995.
59. Goodrow, M.H.; Hammock, B.D.: **Hapten design for compound-selective antibodies: ELISAS for environmentally deletrious small molecules**; *Analytica Chimica Acta*, 376, 83-91, (1998).
60. Abad, A.; Moreno, M.J.; Montoya, A.: **Hapten synthesis and production of monoclonal antibodies to the N-Methylcarbamate Pesticide Methiocarb**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2417-2426, (1998).
61. Keuchel, C.; Weil, L.; Niessner, R.: **Effect of variation of the length of the spacer in a competitive enzyme immunoassay for the determination of 2,4,6-trinitrotoluene**; *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 343, 143, (1992).
62. Wortberg, M.; Goodrow, M.H.; Gee, S.J.; Hammock, B.D.: **Immunoassay for simazine and Atrazine with low cross reactivity for propazine**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2210-2219, (1996).
63. Goodrow, M.H.; Harrison, R.O.; Hammock, B.D.: **Hapten synthesis, antibody development and competitive inhibition enzyme immunoassay for s-triazine herbicides**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 990-996, (1990).
64. Spinks, C.A.; Wyatt, G.M.; Lee, H.A.; Morgan, M.R.A.: **Molecular modeling of hapten structure and relevance to broad specificity immunoassays of sulfonamide anitbiotics**; *Bioconjugate Chemistry*; 10, 583-588, (1999).
65. Schneider,P.; Hammock, B.D.: **Influence of the ELISA format an the hapten-enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for s-Triazine herbicides using monoclonal antibodies**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 525-530, (1992).

66. Schuetz, A.J.; Winklmaier, M.; Weller, M.G.; Niessner, R.: **Selection of haptens structures for indirect immunosensor arrays**; *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 363, 625-631, (1999).
67. Pfeifer-Fukumura, U.; Hartmann, I.; Holthues, H.; Baumann, W.: **New developments in immunochemical water analysis down to 30µL sample volume**; *Talanta*, 48, 803-819, (1999).
68. Holthues, H.: **Das Heterologieprinzip bei Immunoassays; Eine kontrovers diskutierte Hypothese**; Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, (1998).
69. Arrhenius, S.: **Über die Dissoziation der im Wasser gelösten Stoffe**; *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 1, 631-648, (1887).
70. Ostwald, W.: **Grundlagen der Analytischen Chemie**, Theodor Steinkopf, Dresden Leipzig, (1894).
71. Friedenthal, H.: **Die Bestimmung der Reaktion einer Flüssigkeit mit Hilfe von Indikatoren**; *Zeitschrift für Elektrochemie*, 10, 113-119,(1904).
72. Fernbach, A.; Hubert, L.: **De l'influence des phosphates et de quelques autres matieres minerales sur la diastase proteolytique du malt**; *Compt. Rend.* 131, 293-295, (1900).
73. Sørensen, S.P.L.: **Enzymstudien II. Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionen-Konzentration bei enzymatischen Prozessen**; *Biochemische Zeitschrift*, 21, 131-199,(1909).
74. Brønstedt, J.N.: **Zur Theorie der Säuren und Basen und der proteolytischen Lösungsmittel**; *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 169 A, 52-74, (1934).
75. Lewis, G.N.: **The Atom and the Molecule**; *Journal of the American Chemical Society*, 38,762-785, (1916).

76. Wicke, E.; Eigen, M.; Ackermann, T.: **Über den Zustand des Protons (Hydroniumions) in wässriger Lösung**; *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 1, 343-364, (1954).
77. Light, T.S.; Licht, S.L.: **Conductivity and Resistivity of water from the melting to critical points**; *Analytical Chemistry*, 59, 2327-2330, (1987).
78. Covington, A.K.; Bates, R.G.; Durst, R.A.: **Definition of pH scales, standard reference values, measurement of pH and related terminology**; *Pure and Applied Chemistry*, 57, 531-542, (1985).
79. Galster, H.: **pH-Messung**; VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, (1990).
80. Haugland, R.P.: **Handbook of Fluorescent probes and research chemicals**; Molecular Probes, Eugene Oregon, Sixth Edition (1996).
81. Wolfbeis, O.S.; Furlinger, E.; Kroneis, H.; Marsoner, H.: **Fluorimetric Analysis 1. A study on fluorescent indicators for measuring near neutral ("physiological") pH-values**; *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie*, 314, 119-124, (1983).
82. Huber, W.: **Ecotoxicological relevance of Atrazine in aquatic systems**; *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 1865-1881, (1993).
83. Lamoureux, G.L.; Simoneaux, B.; Larson, J.: **The metabolism of Atrazine and related 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-s-triazines in plants**; in ACS Symposiums Series 683, Ed. Ballantine, L.G.; McFarland, J.E.; Hackett, D.S.; (1998).
84. LeBaron, H.M.: **The Role of Triazines in Managing Weeds Resistant to other herbicides**; in ACS Symposiums Series 683, Ed. Ballantine, L.G.; McFarland, J.E.; Hackett, D.S.; (1998).
85. Grigg, B.C.; Assaf, N.A.; Turco, R.F.: **Removal of Atrazine contamination in soil and Liquid systems using bioaugmentation**; *Pesticide sciences*, 50, 211-220, (1997).
86. Sadowsky, M.J.; Wackett, L.P.; DeSouza, M.L.; Boundy-Mills, K.L.; Mandelbaum, R.T.: **Genetics of Atrazine Degradation in Pseudomonas sp. Strain AFP**; in ACS Symposiums

- Series 683, Ed. Ballantine, L.G.; McFarland, J.E.; Hackett, D.S.; (1998).
87. Wu, J.; Robinson, R.A.; Simoneaux, B.: **Metabolism of selected s-Triazines in Animals**; in ACS Symposiums Series 683, Ed. Ballantine, L.G.; McFarland, J.E.; Hackett, D.S.; (1998).
88. Hauswirth, J.W.; Wetzel, L.T.: **Toxicity Characteristics of the 2-Chlorotriazines Atrazine and Simazine**; in ACS Symposiums Series 683, Ed. Ballantine, L.G.; McFarland, J.E.; Hackett, D.S.; (1998).
89. Thakur, A.K.; Wetzel, L.T.; Voelker, R.W.; Wakefield, A.E.: **Results of a two year Oncongenicity Study in Fischer 344 Rats with Atrazine**; in ACS Symposiums Series 683, Ed. Ballantine, L.G.; McFarland, J.E.; Hackett, D.S.; (1998).
90. Rawn, D.F.; Halldorson, T.H.J.; Muir, D.C.G.: **Atmospheric transport and deposition, an additional pathway for Atrazine to surface waters**; in ACS Symposiums Series 683, Ed. Ballantine, L.G.; McFarland, J.E.; Hackett, D.S.; (1998).
91. Oberwalder, C.; Giessl, H.; Irion, L.; Kirchhoff, J.; Hurle, K.: **Pflanzenschutzmittel im Niederschlagswasser**; *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 43, 185-191, (1991).
92. Sigua, G.C.; Isensee, A.R.; Sadeghi, A.M.; Im, G.J.: **Distribution and Transport of Atrazine as influenced by surface cultivation, earthworm population and rainfall patterns**; *Chemosphere*, 31, 4237-4242, (1995).
93. Dankwardt, A.; Hock, B.; Simon, R.; Freitag, D.; Kettrup, A.: **Determination of non-extractable triazine residues by enzyme immunoassay: investigation of model compounds and soil fulvic and humic acids**; *Environmental Science and Technology*, 30, 3493-3500, (1996).
94. Dallüge, J.; Hankemeier, T.; Vreuls, R.J.J.; Brinkmann, U.A.Th.: **On-line coupling of immunoaffinity based solid-phase extraction and gas chromatography for the determination of s-triazines in aqueous samples**; *Journal of Chromatography A*, 830, 377-386, (1999).

95. Pinto, G.M.F.; Jardim, I.C.S.F.: **Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method**; *Journal of chromatography A*, 869, 463-469, (2000).
96. Loos, R.; Niessner, R.: **Analysis of Atrazine, terbutylazine and their N-Dealkylated chloro and hydroxy metabolites by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-ultraviolet detection**; *Journal of chromatography A*, 835, 217-229, (1999).
97. Thurman, E.M.; Snavley, K.: **Advances in solid-phase extraction disks for environmental chemistry**; *Trends in Analytical Chemistry*, 19, 18-26, (2000).
98. Dost, K.; Jones, D.C.; Auerbach, R.; Davidson, G.: **Determination of pesticides in soil samples by supercritical fluid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry detection**; *Analyst*, 125, 1751-1755, (2000).
99. Okihashi, M.; Akutsu, K.; Obana, H.; Hori, S.: **Determination of triazine herbicides in food with liquid chromatography mass spectrometry**, *Analyst*, 125, 1966-1969, (2000).
100. Yokley, R.; Cheung, M.W.: **Analytical method for the determination of Atrazine and its dealkylated chlorotriazine metabolites in Water using Gas chromatography/Mass selective Detection**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 48, 4500-4507, (2000).
101. DiCorcia, A.; Crescenzi, C.; Guerriero, E.; Samperi, R.: **Ultratrace determination of Atrazine and its major degradation products in water by solid-phase extraction and Electrospray/mass spectrometry**; *Environmental Science and Technology*, 31, 1658-1663, (1997).
102. Sabik, H.; Cooper, S.; Lafrance, P.; Fournier, J.: **Determination of Atrazine, its degradation products and metolachlor in runoff water and sediments using solid-phase extraction**; *Talanta*, 42, 717-724, (1995).
103. Hernandez, F.; Hidalgo, C.; Sancho, J.V.; Lopez, F.J.: **Coupled-Column Liquid Chromatography applied to the trace-level determination of triazine herbicides and**

- some of their metabolites in water samples**; *Analytical Chemistry*, 70, 3322-3328, (1998).
104. Cai, Z.; Cerny, R.L.; Spalding, R.F.: **Microbore liquid chromatographic mass spectrometric determination of Atrazine and its major hydroxylated degradate in water at ppt levels using electrospray**; *Journal of Chromatography A*, 753, 243-251, (1996).
105. Bucheli, T.D.; Gruebler, F.C.; Müller, R.S.; Schwarzenbach, R.P.: **Simultaneous determination of neutral and acidic pesticides in natural waters at the low nanogram per liter level**; *Analytical Chemistry*, 69, 1569-1576, (1997).
106. Bernal, J.L.; Jimenez, J.J.; Rivera, J.M.; Toribio, R.L.; del Nozal, M.J.: **On-line solid phase extraction coupled to supercritical fluid chromatography with diode array detection for the determination of pesticides in water**; *Journal of Chromatography A*, 754, 145-157, (1996).
107. Aguilar, C.; Borrull, F.; Marce, R.M.: **On-line and off-line solid phase extraction with styrene-divenylbenzen-membrane extraction disks for determining pesticides in water by reversed phase liquid chromatography-diode array detection**; *Journal of Chromatography A*, 754, 77-84, (1996).
108. Rodolico, S.; Giovinazzo, R.; Mosconi, M.: **Comparison between ELISA's and traditional analytical methods to determine pesticide pollution in water**; *Bullentin of Environmetal Contamination and Toxicology*, 58, 644-650, (1997).
109. Gong, A.; Ye, C.: **Analysis of trace Atrazine and simazine in environmental samples by liquid chromatography-fluorescence detection with pre-column derivatization reaction**; *Journal of chromatography A*, 827, 57-63, (1998).
110. Belden, J.B.; Hofelt, C.S.; Lydy, M.J.: **Analysis of multiple pesticides in urban storm water using solid-phase extraction**; *Archieves of environmental contamination and Toxicology*, 38, 7-10, (2000).
111. Pomes, M.L.; Thurman, E.M.; Aga, D.S.; Goolsby, D.A.: **Evaluation of microtiter plate Enzyme Linked Immunosorbent assay for the analysis of triazines and chloroacetanilide herbicides in Rainfall**; *Environmental Science and Technlogy*, 32, 163-

- 168, (1998).
112. Turiel, E.; Fernandez, P.; Perez-Conde, C.; Gutierrez, A.M.; Camara, C.: **Oriented antibody immobilization for Atrazine determination by a flow-through fluoroimmunosensor**; *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 365, 658-662, (1999).
113. Keay, R.W.; McNeil, C.J.: **Separation-free electrochemical immunosensor for rapid determination of Atrazine**; *Biosensor and Bioelectronics*, 13, 963-970, (1998).
114. Gonzáles-Martínez, M.A.; Puchades, R.; Maquieira, A.; Ferrer, I.; Marco, M.-P.; Barceló, D.: **Reversible immunosensor for the automatic determination of Atrazine. Selection and performance of three polyclonal antisera**; *Analytica Chimica Acta*, 386, 201-210, (1999).
115. Gauglitz, G.: **Optical Sensors Based on Microtiterplate Dimensions**, *Mikrochimica Acta*, 131, 9-17, (1999).
116. Bescombes, J.-L.; Cosnier, S.; Labbé; Reverdy, G.: **A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, Atrazine and carbamate pesticides**; *Analytica Chimica Acta*, 311, 255-263, (1995).
117. Winkelmaier, M.; Schuetz, A.J.; Weller, M.G.; Niessner, R.: **Immunochemical Array for the identification of cross-reacting Analytes**; *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 363, 731-737, (1999).
118. Yokoyama, K.; Ikebukuro, K.; Tamiya, E.; Karube, I.; Ichiki, N.; Arikawa, Y.: **Highly sensitive quartz crystal immunosensors for multisample detection of pesticides**; *Analytica Chimica Acta*, 304, 139-145, (1995).
119. Luo, C.; Lui, M.; Mo, Y.; Qu, J.; Feng, Y.: **Thickness-shear mode acoustic sensor for Atrazine using molecular imprinted polymer as recognition element**; *Analytica Chimica Acta*, 428, 143-148, (2001).
120. Starodub, N.F.; Dzantiev, B.B.; Starodub, V.M.; Zherdev, A.V.: **Immunosensor for the determination of the herbicide Simazine based on an ion-selective field-effect**

- transistor**; *Analytica Chimica Acta*, 424, 37-43, (2000).
121. Killard, A.J.; Micheli, L.; Grennan, K.; Franek, M.; Kolar, V.; Moscone, D.; Palchetti, I.; Smyth, M.R.: **Amperometric separation free immunosensor for real time environmental monitoring**; *Analytica Chimica Acta*, 427, 173-180, (2001).
122. Weller, M.G.; Schuetz, A.J.; Winklmaier, M.; Niessner, R.: **Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water**; *Analytica Chimica Acta*, 393, 29-41, (1999).
123. Engel, L.; Baumann, W.: **Direct potentiometric immunoelectrodes; III. A graphite based Atrazine immunoelectrode**, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 346, 745-751, (1993).
124. Skládál, P.; Deng, A.; Kolár, V.: **Resonant mirror-based optical immunosensor: Application for the measurement of Atrazine in soil**; *Analytica Chimica Acta*, 399, 29-36, (1999).
125. Vianello, F.; Signor, L.; Pizzariello, A.; Di Paolo, M.L.; Scarpa, M.; Hock, B.; Giersch, T.; Rigo, A.: **Continuous flow immunosensor for Atrazine detection**; *Biosensor and Bioelectronics*, 13, 45-53, (1998).
126. Bäumner, A.J.; Schmid, R.D.: **Development of a new immunosensor for pesticide detection: a disposable system with liposome-enhancement and amperometric detection**; *Biosensor and Bioelectronics*, 13, 519-529, (1998).
127. Sasaki, S.; Nagata, R.; Hock, B.; Karube, I.: **Novel surface plasmon resonance sensor chip functionalized with organic silica compounds for antibody attachment**; *Analytica Chimica Acta*, 368, 71-76, (1998).
128. Chegél, V.I.; Shirsov, Yu. M.; Piletskaya, E.V.; Piletsky, S.A.: **Surface plasmon resonance sensor for pesticide detection**, *Sensors and Actuators B*, 48, 456-460, (1998).
129. Naessens, M.; Leclerc, J.C.; Tran-Minh, C.: **Fiber optic Biosensor using *Chlorella vulgaris* for Determination of toxic compounds**, *Ecotoxicology and Environmental Safety*,

- 46, 181-185, (2000).
130. Frense, D.; Müller, A.; Beckmann, D.: **Detection of environmental Pollutants using optical biosensor with immobilized algae cells**; *Sensors and Actuators B*, 51, 256-260, (1998).
131. Parellada, J.; Narváez, A.; López, M.A.; Domínguez, E.; Fernández, J.J.; Pavlov, V.; Katakis, I.: **Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications**; *Analytica Chimica Acta*, 362, 47-57, (1998).
132. Yazynina, E.V.; Zherdev, A.V.; Dzantiev, B.B.; Izumirudov, V.A.; Gee, S.J.; Hammock, B.D.: **Microplate immunoassay technique using polyelectrolyte carriers: kinetic studies and application to the detection of the herbicide Atrazine**, *Analytica Chimica Acta*, 399, 151-160, (1999).
133. Wittmann, C.; Hock, B.: **Improved Enzyme Immunoassay for the Analysis of s-Triazines in Water Samples**; *Food and Agricultural Immunology*, 1, 211-224, (1989).
134. Wittmann, C.; Bilitewski, U.; Giersch, T.; Kettlind, U.; Schmid, R.D.: **Development and Evaluation of a Dipstick Immunoassay Format for the Determination of Atrazine Residues On-site**; *Analyst*, 121, 863-869, (1996).
135. Stöcklein, W.F.M.; Rohde, M.; Scharte, G.; Behrsing, O.; Warsinke, A.; Micheel, B.; Scheller, F.W.: **Sensitive Detektion of Triazine and Phenylurea Pesticides in Pure Organic Solvent by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Stabilities, Solubilities and Sensitivities**; *Analytica Chimica Acta*, 405, 255-265, (2000).
136. Shan, G.; Huang, W.; Gee, S.J.; Buchholz, B.A.; Vogel, J.S.; Hammock, B.D.: **Isotope-labeled immunoassay without radiation waste**; *Proceedings of the national academy of science*, 97, 2445-2449, (2000).
137. Sendra, Panadero, S.; Eremin, S.; Gomez-Henz, A.: **Kinetic Determination of Atrazine in foods based on stopped-flow fluorescence polarization Immunoassay**; *Talanta*, 47, 153-160, (1998).

138. Önnerfjord, P.; Eremin, S.; Emneus, J.; Marko-Varga, G.: **High sample throughput flow Immunoassay utilising restricted access columns for the separation of bound and free lable**, *Journal of Chromatography A*, 800, 219-230, (1998).
139. Önnerfjord, P.; Eremin, S.; Emneus, J.; Marko-Varga, G.: **Fluorescence polarisation for immunoreagent characterisation**; *Journal of Immunological Methods*, 213, 31-39, (1998).
140. Länge, G.; Rapp, F.-R.; Gauglitz, G.; Brecht, A.: **Flow injection immunotitration: extended working range for inhibition type immunodetection**; *Analytica Chimica Acta*, 399, 275-286, (1999).
141. Krämer, P.M.; Baumann, B.A.; Stoks, P.G.: **Prototype of a newly developed immunochemical detection system for the determination of pesticide residues in water**, *Analytica Chimica Acta*, 347, 187-198, (1997).
142. Kärmer, P.M.; Franke, A.; Standfuß-Gabisch, C.: **Flow injection immunoaffinity analysis (FIIAA)- A screening technology for Atrazine and Diuron in water samples**; *Analytica Chimica Acta*, 399, 89-97, (1999).
143. Dankwardt, A.; Pullen, S.; Rauchalles, S.; Kramer, K.; Just, F.; Hock, B.: **Atrazine residues in soil two years after the Atrazine ban- a comparison of Enzyme immunoassay with HPLC**; *Analytical Letters*, 28, 621-634, (1995).
144. Comber, S.D.W.; Watts, C.D.; Young, B.: **Analytical performance testing of an Atrazine immunoassay system**; *Analyst*, 121, 1485-1488, (1996).
145. Winklmair, M.; Weller, M.G.; Mangler, J.; Schlosshauer, B.; Niessner, R.: **Development of a highly sensitive enzyme immunoassay for the determination of triazine herbicides**; *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 358, 614-622, (1997).
146. Burestedt, E.; Nistor, C.; Schagerlöf, U.; Emnéus, J.: **An Enzyme flow immunoassay that uses  $\beta$ -Galactosidase as the label and a cellobiose Dehydrogenase biosensor as the label detector**; *Analytical Chemistry*, 72, 4171-4177, (2000).

147. Hottenstein, C.S.; Rubio, F.M.; Herzog, D.P.; Fleeker, J.R.; Lawruk, T.S.: **Determination of trace Atrazine levels in water by a sensitive magnetic particle-based enzyme immunoassay**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3676-3581, (1996).
148. Reimer, G.J.; Gee, S.J.; Hammock, B.D.: **Comparison of a time resolved fluorescence immunoassay and an enzyme linked immunosorbent assay for the analysis of Atrazine in water**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3353-3358, (1998).
149. Gascón, J.; Oubina, A.; Ferrer, I.; Önnarfjord, P.; Marko-Varga, G.; Hammock, B.D.; Marco, M.-P.; Barcelo, D.: **Performance of two immunoassays for the determination of Atrazine in sea water samples as compared with on-line solid phase extraction-liquid chromatography-diode array detection**; *Analytica Chimica Acta*, 330, 41-51, (1996).
150. Abraham, E.P.; Chain, E.: **A enzyme from bacteria able to destroy penicillin**; *Nature*, 146, 837, (1949).
151. Sloma, A.; Gross, M.: **Molecular cloning and nucleotide sequence of the type I  $\beta$ -Lactamase gene from *Bacillus cereus***; *Nucleic acid Research*, 11, 4997-4004, (1984).
152. Dideberg, O.; Charlier, P.; Wery, J.-P.; Dehottay, P.; Dusart, J.; Erpicum, T.; Frere, J.-M.; Ghysen, J.-M.: **The crystal structure of  $\beta$ -Lactamase of *Streptomyces albus G* at 0.3 nm resolution**; *Biochemical Journal*, 245, 911-913, (1987).
153. Ullmann's Encyclopedia of industrial Chemistry, Vol. A2; **Antibiotics**, 467-557, Ed. Gerhartz, W.; VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1985).
154. Kirk-Othmer Encyclopedia of chemical technology, Vol.2/3, **Antibiotics**, Hrsg. Mark, H.; Wiley, New York, (1992).
155. Ullmanns Ezyklopädie der technischen Chemie; Band 7, **Antibiotica**, 647-706, Hrsg. Bartholome, E.; VCH, Weinheim, (1974).
156. Cartwright, J.; Tan, A.K.; Fink, A.L.: **Trapping the acyl-enzyme intermediate in  $\beta$ -Lactamase I catalysis**; *Biochemical Journal*, 263, 905-912, (1989).

157. Citri, N.: **Penicillinase and other  $\beta$ -Lactamases**, in *The Enzymes*; Ed. Boyer, P.D.; 3<sup>rd</sup> Edition; Academic Press, New York, (1970).
158. Martin, M.T.; Waley, S.G.: **Kinetic characterization of the acyl-enzyme mechanism for  $\beta$ -Lactamase I**; *Biochemical Journal*, 254, 923-925, (1988).
159. Christensen, H.; Martin, M.T.; Waley, S.G.:  **$\beta$ -Lactamases as fully efficient enzymes**; *Biochemical Journal*, 266, 853-861, (1990).
160. Liras, P.; Rodriguez-Garcia, A.: **Clavulanic acid, a  $\beta$ -Lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics**; *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 467-475, (2000).
161. Cohen, S.A.; Pratt, R.F.: **Inactivation of *Bacillus Cereus*  $\beta$ -Lactamase I by 6 $\beta$ -Bromopenicillanic acid: Mechanism**; *Biochemistry*, 19, 3996-4003, (1980).
162. Kiener, P.A.; Knott-Hunzinger, V.; Petursson, S.; Waley, S.G.: **Mechanism of substrate induced inactivation of  $\beta$ -Lactamase I**; *European Journal of Biochemistry*, 109, 575-580, (1980).
163. Schenkein, D.P.; Pratt, R.F.: **Phenylpropynal, a specific irreversible, non- $\beta$ -lactam inhibitor of  $\beta$ -Lactamases**; *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 45-48, (1980).
164. Page, M.G.P.:  **$\beta$ -Lactamase inhibitors**; *Drug Resistance Update*, 3, 109-125, (2000).
165. Pollock, M.R.: Penicillinase; in **The Enzymes**; Ed. Boyer, P.D.; 2<sup>nd</sup> Edition; Academic Press, New York, (1959).
166. Khatkhatay, M.I.; Desai, M.: **A Comparison of performances of four enzymes used in ELISA with special reference to beta-Lactamase**; *Journal of Immunoassay*, 20, 151-183, (1999).
167. Rassaie, M.J.; Kumari, G.L.; Rao, P.N.; Shrivastav, T.G.; Pandey, H.P.: **Influence of different combinations of antibodies and penicillinase labeled testosterone derivatives on sensitivity and specificity of immunoassays**; *Steroids*, 57, 112-118,

- (1992).
168. Rassaie, M.J.; Kumari, G.L.; Pandey, P.K.; Gupta, N.; Kochupillai, N.; Grover, P.K.: **A highly specific heterologous enzyme-linked immunosorbent assays for measuring testosterone in plasma using antibody coated immunoassays plates or polypropylene tubes**; *Steroids*, 57, 288-294, (1992).
169. Sergeyeva, T.A.; Soldatkin, A.P.; Rachkov, A.E.; Tereschenko, M.I.; Piletsky, S.A.; El'skaya, A.V.:  **$\beta$ -Lactamase label-based potentiometric biosensor for  $\alpha$ -interferon detection**; *Analytica Chimica Acta*, 390, 73-81, (1999).
170. Novick, R.P.: **Micro-Iodometric Assay for Penicillinase**; *Biochemical Journal*, 83, 236-240, (1962).
171. Koncki, R.; Leszczynska, E.; Cybulska, A.; Glab, S.: **Penicillin enzyme biosensors based on pH membrane electrodes**; *Analytica Chimica Acta*, 321, 27-34, (1996).
172. Tor, R.; Freeman, A.: **New enzyme membrane for enzyme electrodes**; *Analytical Chemistry*, 58, 1042-1046, (1986).
173. Brand, U.; Reinhardt, B.; R  ther, F.; Scheper, T.; Sch  gerl, K.: **Bio-field-effect transistors as detectors in flow injection analysis**; *Analytica Chimica Acta*, 238, 201-210, (1990).
174. Gnanasekaran, R.; Mottola, H.A.: **Flow injection determination of penicillins using immobilized Penicillinase in a single bead string reactor**; *Analytical Chemistry*, 57, 1005-1009, (1985).
175. Olsson, B.: **A flow-injection system based on immobilized penicillinase and a linear pH-buffer for potentiometric determinations of penicillin**; *Analytica Chimica Acta*, 209, 123-133, (1988).
176. Decristoforo, G.; Danielsson, B.: **Flow injection analysis with enzyme thermistor detector for automated determination of  $\beta$ -Lactams**; *Analytical Chemistry*, 56, 263-268, (1984).

177. Giersch, T.; Hock, B.: **Production of monoclonal antibodies for the determination of s-triazines with enzyme immunoassay**; *Food and Agricultural Immunology*, 2, 85-97, (1990).
178. Weller, M.G.; Niessner, R.: **Affinity patterns of enzyme tracers for triazine immunoassay**; *SPIE*, 3105, 341-352, (1997).
179. Hesketh, N.; Jones, M.N.; Tipping, E.: **The interaction of some pesticides and herbicides with humic substances**; *Analytica Chimica Acta*, 327, 191-201, (1996).
180. Schmitt, P.; Freitag, D.; Trapp, I.; Garrison, A.W.; Schiavon, M.; Kettrup, A.: **Binding of s-Triazines to dissolved humic substances: electrophoretic approach using affinity capillary electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography**; *Chemosphere*, 35, 55-75, (1997).
181. Hock, B.; Fedtke, C.; Schmidt, R.R.: **Herbizide**; Thieme; (1995).
182. Dankwardt A.: **Entwicklung und Anwendung von Immunoassays in der Rückstandsanalytik von Atrazin- Untersuchung von Regenwasser Oberflächenwasser und gebundenen Rückständen**, TU München, Dissertation (1994).
183. Rubio, F.M.; Itak, J.A.; Scutellaro, A.M.; Selisker, M.Y.; Herzog, D.P.: **Performance characteristics of a novel magnetic-particle-based ELISA for the Quantitative Analysis of Atrazine and related Triazines in water samples**, *Food and Agricultural Immunology*, 3, 113-125, (1991).
184. Oubina, A.; Gascon, J.; Ferrer, I.; Barcelo, D.: **Evaluation of a magnetic particle based ELISA for the determination of chlorpyrifosethyl in natural waters and soil samples**; *Environmental Science and Technology*, 30, 509-512, (1996).
185. Gascon, J.; Martinez, E.; Barceló, D.: **Determination of Atrazine and Alachlor in natural waters by a rapid- magnetic particle-based ELISA**, *Analytica Chimica Acta*, 311, 357-364, (1995).

186. Purushothama, S.; Kradtap, S.; Wijayawardhana, C.A.; Halsall, H.B.; Heineman, W.R.: **Small volume bead assays for ovalbumin with electrochemical detection**; *Analyst*, 126, 337-341, (2001).
187. Yu, H.; Raymond, J.W.; McMahon, T.M.; Campagnari, A.A.: **Detection of biological threat agents by immunomagnetic microsphere based solid phase fluorogenic- and electro-chemiluminescence**; *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 829-840, (2000).
188. Bastos-Gonzales, D.; Ortega-Vinuesa, F.J.; De las Nieves, F.J.; Hidalgo-Alvarez, R.: **Carboxylated latexes for covalent coupling of antibodies I**; *Journal of Colloid and Interface Science*, 176, 232-239, (1995).
189. Bastos-Gonzales, D.; Ortega-Vinuesa, F.J.; Hidalgo-Alvarez, R.: **Comperative Studies on physically adsorbed and chemically bound IgG to carboxylated Latexes II**; *Journal of Colloid and Interface Science*, 176, 240-247, (1995).
190. Gonzales-Martinez, M.A.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, A.; Marco, M.P.; Barcelo, D.: **Automation of an heterogeneous enzyme immunoassay for Atrazine. Comparison of three immobilization supports**; *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 361, 179-184, (1998).
191. Huber, S.J.; Hock, B.: **Solid Phase Enzymimmunoassay zum Nachweis von Pflanzenschutzmitteln in Gewässern**, *GIT Fachzeitschrift für das Labor*, 10, 969-977, (1985).
192. Polyscience, Inc.; Microsphere Katalog, 1999-2000.
193. Nalge Nunc International; NUNC Katalog; 1999.
194. Eremin, S.A.: **Polarization fluoroimmunoassay for rapid, specific detection of pesticides**; *ACS Symposium Series 586*, Ed. Nelson, J.O.; Karu, A.E.; Wong, R.B., 225-234, (1995).

195. Engvall, E.: **Enzyme immunoassay ELISA and EMIT**; *Methods in Enzymology* Vol.70, Ed. Vanvunakis, H.; Langone, J.J., (1980).
196. Stangl, G.; Weller, M.G.; Niessner, R.: **Increased sensitivity and selectivity of an enzyme linked immunosorbent assay for the determination of Atrazine by non-ionic surfactants**; *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 351, 301.304, (1995).
197. Hartmann, I.: **Immunoassays in der Wasseranalytik**; Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, (1996).
198. Harlow, E.; Lane, D.: **Antibodies, a laboratory manual**; Cold Spring Harbor Laboratory (1988).
199. Gonzales-Martinez, M.A.; Puchades, R.; Maquieira, A. : **Comparison of multianalyte immunosensor formats for on-line determination of organic compounds**; *Analytical Chemistry*, 73, 4326-4332, (2000).