



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Synthetische Immunglobuline als Antikörper gegen Sesamproteine

Verfasserin

Jianjin Qian

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2009

Studienkennzahl	A 419
Studienblatt:	
Studienrichtung	Chemie
Studienblatt:	
Betreuerin / Betreuer:	O. Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Dickert

Vorwort

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

Besonderer Dank geht an

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

Weiters danke ich Frau Dr. Romana Schirhagl, Mag. Paul Grillberger, Mag. Alexander Biedermann und all meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe für fruchtbare Anregungen und Diskussionen sowie Hilfsbereitschaft und ein gutes Arbeitsklima.

INHALT

I.	Einleitung	7
II.	Theorieteil	8
II.1.	Chemosensoren	8
II.2.	Quartz Crystal Micro Balances (QMB)	9
II.3.	Atomic Force Microscopy (AFM)	10
II.4.	Das menschliche Immunsystem	11
II.5.	Die Immunglobuline	13
II.6.	Sesam und seine Bedeutung als Allergen	14
III.	Experimenteller Teil: QCM-Sensor basierend auf einem synthetischen Immunglobulin	17
III.1.	Das Konzept	17
III.2.	Herstellung der Partikel	18
III.3.	Auswaschen der Antikörper	19
III.4.	Aufbringen Goldelektrode auf Schwingquarze	20
III.5.	Mit Partikeln geprägte Schwingquarze	21
IV.	Ergebnis und Diskussion	23
IV.1.	Künstliche Antikörper zur Detektion von Sesamproteinen	23
IV.1.1.	Messungen zur Selektivität der Schichten	27
IV.1.2.	Einfluss des Antikörperverbrauchs auf dem Messeffekt	31
IV.2.	Natürliche Antikörper zur Detektion von Sesamproteine	39
IV.3.	Direkte Prägung von Polymethacrylsäure/Polyvinyl-pyrrolidon-Copolymer mit Sesamprotein und Erdnussprotein	41
V.	Zusammenfassung & Summary	50
VI.	Lebenslauf	53
VII.	Literatur	55

I. Einleitung

Die moderne Chemie dringt in zusehends kleinere Dimensionen vor und versucht die Natur sowohl auf molekularer als auch auf atomarer Ebene zu verändern und zu gestalten.¹ Die Herausforderung für die moderne analytische Chemie besteht darin immer kleinere Mengen an Analytsubstanz detektieren zu können. Dabei sind molekular geprägte Polymere (Molecular Imprinted Polymers), die in der Lage sind ihr Zielmolekül (wie zum Beispiel Thiole², Viren³ oder sogar ganze Zellen⁴) spezifisch zu binden, wegen ihrer potentiellen Anwendungen als Sensoren in der Trenntechnik oder Katalyse immer wichtiger geworden. Die Verwendung von geprägten Nanopartikel hat den Vorteil, dass die Wechselwirkungsfläche sehr stark vergrößert wird.^{5,6} Solche Partikel können beispielsweise in der HPLC als Säulenmaterial eingesetzt werden. Außerdem wird durch die Verwendung von geprägten Partikeln auch die Selektivität von Katalyse oder molekularer Erkennung erhöht.

Auch in der Medizin sind derartige Anwendungen denkbar, so werden zum Beispiel geprägte Partikel zur Entfernung von Cholesterol aus einem biologischen System eingesetzt.⁷ Antikörper sind aufgrund ihrer immensen Bedeutung für unser Immunsystem und damit für die menschliche Gesundheit natürlich sehr interessante Moleküle.⁸ Die vielen existierenden Erkrankungen des Immunsystems, wie AIDS oder Allergien, sind Thema intensiver Forschungsarbeit. Da Biomoleküle wie Antikörper aber in der Regel gegen äußere Einflüsse wenig stabil und zudem teuer sind, wurde in dieser Arbeit versucht, mit Hilfe der Technik des molekularen Prägens von Nanopartikeln künstliche Antikörper aus Polymeren herzustellen. Diese sind gegen äußere Einflüsse stabiler und billiger als ihre natürlichen Analoga und darüber hinaus ohne aufwendige Synthesestufen in hoher Qualität herzustellen.

II. Theorieteil

II.1. Chemosensoren

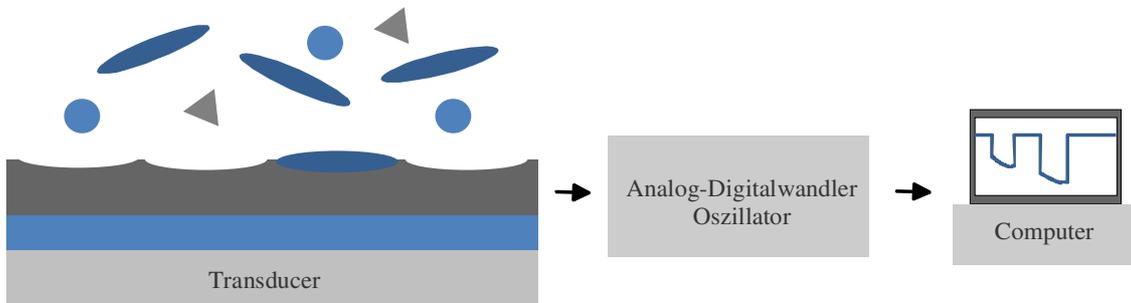


Abbildung 1: Prinzip eines Chemosensors. Verschiedene Größen wie z.B. Massenänderung, Kapazität, Widerstand können gemessen werden.

Ein Chemosensor ist ein Messfühler, der die An- oder Abwesenheit eines Analyten bzw. dessen Konzentrationsänderung in der jeweiligen Phase registriert.⁹ Ein Chemosensor besteht aus drei Teilen: Der sensitiven Schicht, dem Transducer und dem Rechner zur Auswertung. Der Transducer hat die Aufgabe, einen Analyten in einer komplexen Matrix nachzuweisen. Dazu wird eine selektive Schicht auf den Transducer aufgebracht, wo der Analyt sich einlagert. Dabei soll die Empfindlichkeit möglichst hoch sein. Durch die Einlagerung werden bestimmte Änderungen der Schichteigenschaften hervorgerufen (wie z.B. Absorption, Widerstand oder die Masse). Diese Änderungen werden vom Transducer in ein elektrisches Signal umgewandelt. Ein der weitesten verbreitete Chemosensor ist die Lambdasonde, die in Katalysator von Kraftfahrzeugen eingesetzt wird, um das Verhältnis von Treibstoff zu Sauerstoff zu regeln. In diesem Fall ist die sensitive Schicht ein mit Yttrium und Calcium dotiertes Zirkondioxid, die Sauerstoff spezifisch detektiert. Auch die ionenselektiven Elektroden sind Chemosensoren. Dazu gehören z.B. die Glaselektrode, mit der man die Aktivität von H_3O^+ Ionen bestimmt und somit den pH-Wert. Die Vorteile des Chemosensors gegenüber den klassischen chemischen Analysen wie diversen Methoden der Chromatographie oder Spektroskopie sind vor allem die kostengünstige Herstellung sowie einfache und schnelle Anwendung und individuelle Einsetzbarkeit der Sensoren.¹⁰

Ein Chemosensor sollte vor allem die Eigenschaften besitzen, ein reversibles und reproduzierbares Signal zu liefern, schnell anzusprechen, eine stabile Transducerschicht zu besitzen, selektiv und sensitiv auf den Analyten zu reagieren und leicht zu bedienen sein.¹¹

II.2. Quartz Crystal Micro Balances (QMB)

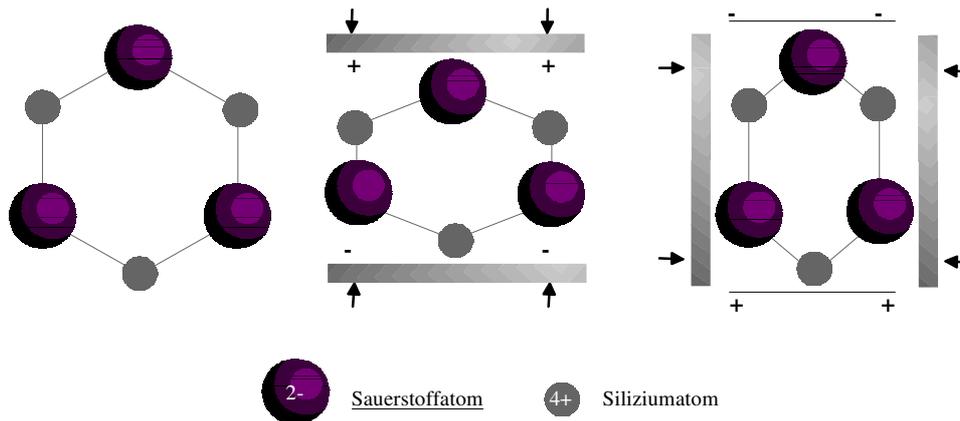


Abbildung 2: Piezoelektrischer Effekt

Quarze deformieren beim Anlegen elektronischer Spannung (inverser Piezoeffekt). Für die Herstellung Massensensitiver Sensoren werden z. B. Quarzplättchen in AT-Schnitt verwendet und darauf Elektroden gebracht. Quarze mit diesem speziellen Schnitt haben die besonderen Eigenschaften, dass beim Anlegen von Wechselspannung, eine Dickenschwingung mit einer bestimmten, extrem konstanten Frequenz angeregt wird. Diese Frequenz ist von der Dicke und in weiterer Folge von der Massebeladung des Quarzes abhängig, was durch die so genannte Sauerbrey-Gleichung (Formel 1) beschrieben wird.¹²

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

Formel 1: Sauerbrey-Gleichung. Δf ist die Frequenzänderung, Δm die Massenänderung, ρ die Dichte der Schicht, A die Elektrodenfläche und d die Dicke der Schicht. Die Dichte der Schicht ist näherungsweise gleich der von Quarz.

Nach der obigen Gleichung verursacht jede Massenänderung des Quarzes auch eine Frequenzänderung, die man im Oszillatorschaltkreis messen kann. Wenn

auf die Elektroden des Quarzes eine sensitive Schicht, die spezifisch auf einen bestimmten Analyten reagiert, aufgebracht wird, wird der Quarz zu einem spezifische massensensitive Sensor.¹³

Die in dieser Arbeit verwendeten Quarzplättchen haben einen Durchmesser von 14 mm und sind ca. 0,168 mm dick. Ihre Grundfrequenz beträgt 10 MHz.¹⁴

II.3. Atomic Force Microscopy (AFM)

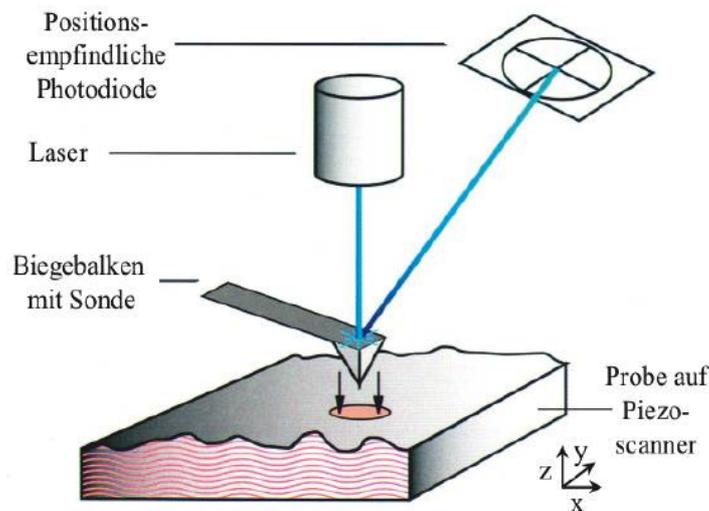


Abbildung 3: Messprinzip der Rasterkraftmikroskopie. Der Laserstrahl wird von dem Biegebalken auf eine positionsempfindliche Photodiode reflektiert. Der Piezoscanner rastert die Probe lateral (x,y) und verschiebt die Probe in z-Richtung so, dass immer die gleiche Durchbiegung des Biegebalkens gewährleistet ist.

Rasterkraftfeldmikroskopie (AFM) nutzt Van der Waals Kräfte, Coulomb-Kräfte und Kapillarkräfte aus, die bei kleinen Abständen zwischen der Probe und der Spitze auftreten. Die Spitze erfährt, einige hundert Angström von der Probe entfernt, eine leicht anziehende Kraft der Van der Waals Wechselwirkung. Sehr nahe an der Oberfläche treffen die Elektronenhüllen der Probe und Spitze aufeinander, was zu stark abstoßenden Coulombkräften (hängt mit $1/r^{12}$ vom Abstand ab) führt. Der Cantilever, auf dem die Spitze befestigt ist, hat eine reflektierende Beschichtung, worauf der Laser einstrahlt. Biegt der Cantilever, ändert sich die Ablenkung des Lasers. Diese Auslenkung wird detektiert.

Beim Contact-Mode fährt die Spitze, die von einem piezoelektrischen Scanner gesteuert wird, über die Oberfläche und steht dabei in direktem Kontakt zu dieser. Dabei kann die Höhe oder die Kraft konstant gehalten werden. Beim Tapping-Mode schwingt die Spitze mit einer vorgegebenen Frequenz und berührt die Oberfläche während des Ab tastens nur kurz. Es wird das Höhenprofil gemessen. Die geringe Beanspruchung der Probenoberfläche ist besonders für weiche und empfindliche Proben vom Vorteil.

II.4. Das menschliche Immunsystem

Die Immunabwehr schützt vor Gefahren, wie z.B. Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten, den der Mensch in Lebensumwelt ausgesetzt ist. Dazu gehören die anatomischen und physiologischen Barrieren wie Epithelien, die Eindringen der meisten Fremdzellen verhindern. Schaffen Erreger die mechanischen Barrieren zu überwinden, wird im Körper eine Immunreaktion ausgelöst. Die Mechanismen der Immunreaktion sind vielfältig. Die Fresszellen, die ein Teil des angeborenen bzw. unspezifischen Immunsystems sind, sind in der Lage, typische Merkmale von Krankheitserregern zu erkennen, ohne zuvor mit diesem Erreger Kontakt gehabt zu haben. Hierzu gehören z. B. Makrophagen oder dendritische Zellen. Sie können die Krankheitserreger in ihrem Inneren einschließen und vernichten. Das angeborene Immunsystem greift schnell ein und ist sehr effektiv. Für den Fall, dass die Fremdzellen vom Makrophagen nicht erfolgreich erkannt werden, gibt es noch die spezifische Immunabwehr. Sie basiert auf der unspezifischen Immunabwehr und benötigt diese für die Präsentation der Antigene. Die dendritische Zellen spielen dabei eine besondere Rolle. Sie phagozytierten die Erreger und präsentieren anschließend deren Bruchstücke auf ihrer Zelloberfläche. Diese können von der T-Helferzellen erkannt werden, und dadurch die adaptiven bzw. spezifischen Immunabwehr eingeleitet.

Es wird zwischen zwei Subsystemen unterschieden: Bei der humoralen Immunität werden Antikörper von den B-Lymphocyten sezerniert und zirkulieren als lösliche Proteine im Blutplasma. Sie wirken insbesondere gegen Toxine, freie Bakterien und Viren in den Körperflüssigkeiten. Die zellvermittelte Immunität beruht auf der direkten Wirkung von T-Lymphocyten, die gegen in Zellen eingedrungene Bakterien und Viren sowie gegen Pilze,

Einzeller und Wurmparasiten schützen. Außerdem sind sie an der Bekämpfung von transplantiertem Gewebe und von Krebszellen beteiligt.

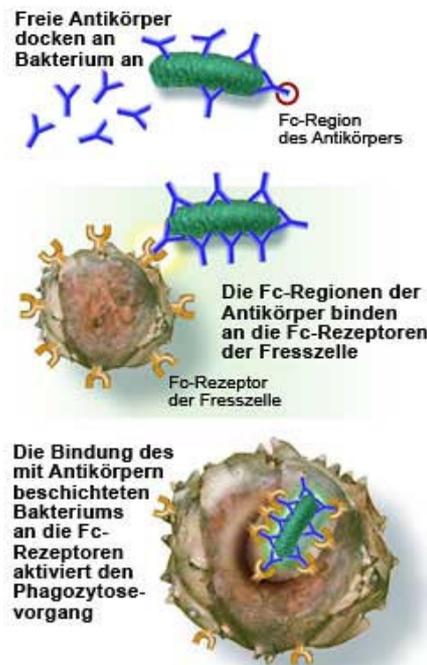


Abbildung 4: Antikörper markieren Bakterien als „Körperfremd“ für die Fresszellen

Die entscheidenden Bestandteile des adaptiven Immunsystems sind die B- und T-Lymphozyten. Sie haben Rezeptoren, die bestimmten Antigene erkennen. Bindet sich ein Antigen an den spezifischen Rezeptor, beginnt der Lymphozyt, sich zu teilen und zu differenzieren. Die T-Lymphozyten differenzieren in der Thymusdrüse. Aus Ihnen entstehen zytotoxischen T-Zellen, die infizierte Zellen und Tumorzellen töten und die T-Helferzellen, die Zytokine abgeben, welche an der Regulation von B- und T-Zellen beteiligt sind.

Die B-Lymphozyten differenzieren in Lymphknotenaggregaten. Nachdem Aktivierung durch Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes setzen sie Antikörper frei, die sich an die speziellen Antigene auf der Oberfläche der Erreger binden können.

Nach dem Erstkontakt können beide Lymphozytenarten Gedächtniszellen bilden, welche sich die Struktur der Antigene für eine wiederholte Infektion merken. Bei der erneuten Infektion verläuft die Abwehrreaktion schneller und heftiger.

Überschießende Immunantwort kann zu Autoimmunerkrankungen und allergischen Reaktionen führen. Bei der Letzteren verliert das Immunsystem die Fähigkeit, auf fremde Eiweiße angemessen zu reagieren. Die übermäßige Aktivierung von Basophilen verursacht allergische Reaktionen. Die Aktivierung im ganzen Körper kann schwere Symptome bis hin zum anaphylaktischen Schock auslösen.

II.5. Die Immunglobuline

Immunglobuline werden von den B-Lymphozyten produziert, wenn sie durch körperfremde Antigene aktiviert werden. Sie sind Proteine, die aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten, die durch kovalente Disulfidbrücken zu einer Ypsilon-förmigen Struktur miteinander verknüpft sind. Die leichten Ketten haben einem Molekulargewicht von ca. 25.000 Da und bestehen aus jeweils einer variablen und einer konstanten Domäne. Die schweren Ketten haben einem Molekulargewicht von ca. 50.000 bis 70.000 Da und bestehen aus einer variablen und drei bis vier konstanten Domänen. Die variablen Domänen einer leichten und einer schweren Kette bilden die Antigenbindungsregion Fab.¹⁵

Die variablen Fab-Regionen unterscheiden sich von Antikörper zu Antikörper in ihrer Aminosäuresequenz und in ihrer dreidimensionalen Struktur. Sie binden komplementär gebautes Antigen, die durch ihre Epitope auf der Oberfläche relativ spezifisch erkannt werden können.

Ein Organismus produziert täglich Millionen verschiedener B-Lymphozyten, damit die Wahrscheinlichkeit genügend gross wird, gegen alle eindringenden fremden Strukturen einen passenden Antikörper aufzuweisen. Jede unreife B-Zelle besitzt Sätze von Genabschnitten, welche für die Bildung funktioneller Immunglobulingene zufällig rekombiniert werden.

Es gibt fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen. Sie unterscheiden sich durch die konstanten Teile der schweren Kette. Sie wird im Rahmen einer langsamen Abwehrreaktion gebildet. Es bleibt lange im Körper erhalten und sind die häufigsten Antikörper. Immunglobuline A fangen Krankheitserreger auf

Körperoberflächen wie der Mund- oder Nasenschleimhaut ab. Immunglobuline M sind bereits in der Frühphase der Immunabwehr aktiv und können gemeinsam mit anderen Bluteiweißen Bakterien zerstören, ohne Hilfe von Makrophagen. Im weiteren Ablauf werden IgM durch IgG abgelöst. Die Immunglobuline E sind im Körper an Mastzellen gebunden und schützen vor Parasiten. Bei Antigenkontakt wird über IgE die Freisetzung von Histaminen und Granulozyten vermittelt. Sprechen sie auf harmlose Antigene, wie z.B. Pollen führt es zu allergischen Reaktionen. Die Funktion von Immunglobuline D ist noch nicht geklärt.

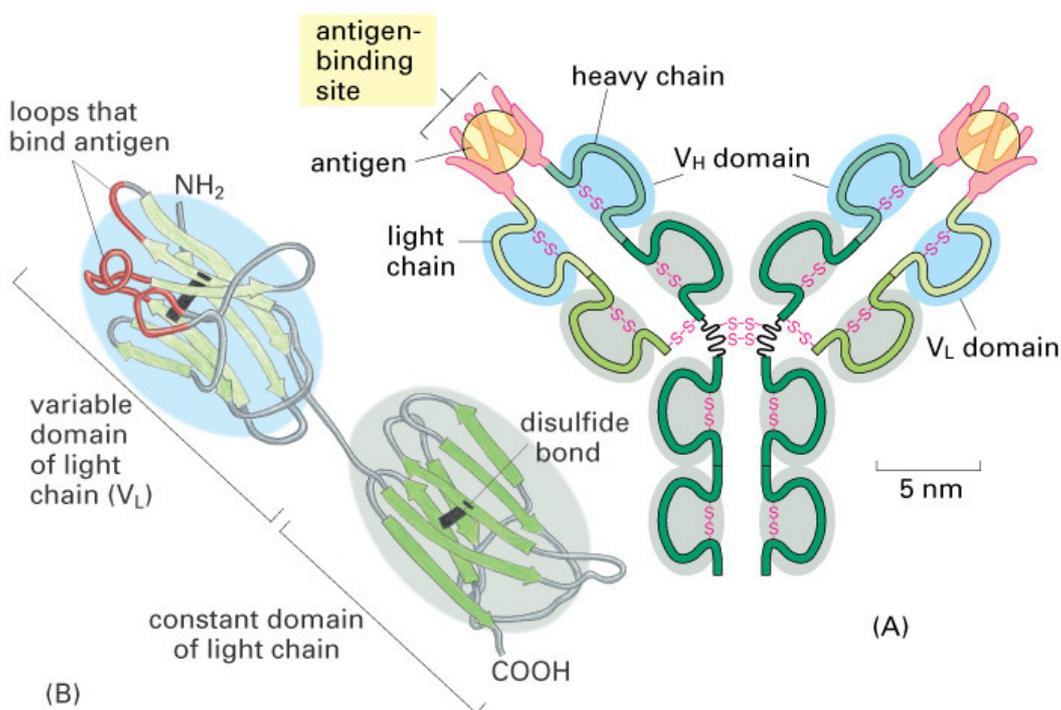


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Immunglobulins und seiner Fab-Region

Zur Detektion von Sesamproteinen wurden Immunglobuline Y, die aus Hühnereiern gewonnen wurden, verwendet. Sie sind in Hühnern das funktionelle Äquivalent zu Ig G.

II.6. Sesam und seine Bedeutung als Allergen

Sesam, mit dem botanischen Namen *Sesamum indicum*, ist eine der ältesten Gewürzpflanzen, die für die Gewinnung von Speiseöl angebaut werden. Er

gehört zur Familie der Pedaliaceae. Getrocknete und geröstete Sesamsamen finden Verwendung in verschiedene Lebensmittel. Die Hauptbestandteile der Sesamsamen sind Sesamöl (50 – 60 %) und Sesamprotein (25 %).

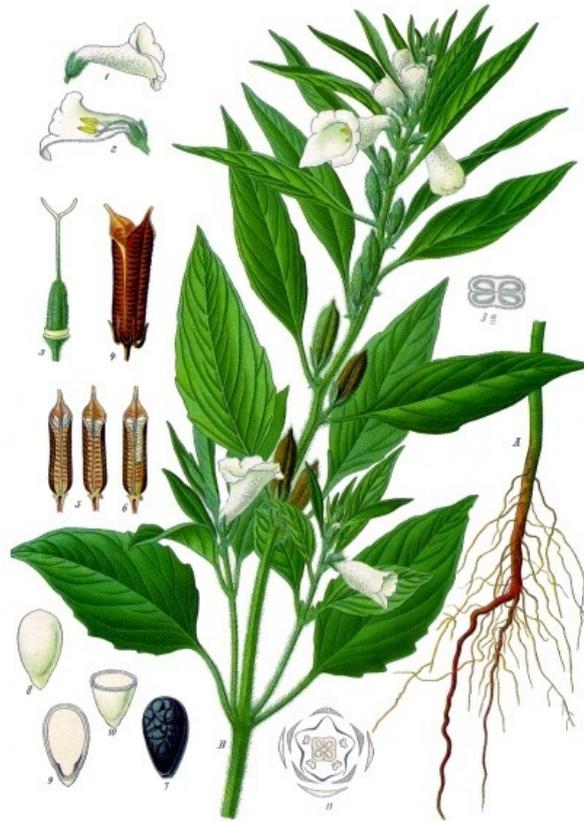


Abbildung 6: Illustration der Pflanze *Sesamum indicum* aus Koehler's *Medicinal-Plants* 1887: 4-6 reife Samenkapsel, 7-11 Sesamsamen

Sesamöl besteht größtenteils aus Triglyceriden der einfach ungesättigten Ölsäure (40 %) und der zweifach ungesättigten Linolsäure (45 %), daneben noch 10 % gesättigten Fetten. Durch die antioxidativ wirkende Sesamol und Sesaminol und die fehlenden dreifach ungesättigten Fettsäuren ist Sesamöl relativ resistent gegen Oxidation. Sesamöl wird zum Würzen vom Speisen, zur Herstellen von Seifen, in Pharmazeutischen Produkten und als Komponente für Insektizide verwendet.

Sesamprotein ist relativ hitzebeständig und enthält große Menge an Methionin. Es enthält einen hohen Anteil der schwefelhaltigen Aminosäuren (3,8 – 5,5 %). Zweidrittel der Proteine sind α -Globuline, der Rest β -Globuline. Das α -Globulin besteht aus 12 Untereinheiten mit Molekulargewichten zwischen 8.000 bis

85.000 Da. Insgesamt hat das α -Globulin ein Molekulargewicht vom ca. 250.000 Da¹⁶, ihr isoelektrischer Punkt liegt bei 4,9. In wässrige Lösung ist Sesamprotein stark löslich im sauren, weniger löslich in alkalischen und neutralen Milieu. Entfettetes Sesammehl wird als Tierfutter und Düngemittel verwendet^{17, 18}. Sesam enthält über 10 allergene Proteine¹⁹. Es genügen eine Konzentration von wenigen ppm (mg Sesam / kg Nahrungsmittel), um eine allergische Reaktion hervorzurufen. Bisher ist es möglich Allergene mittels immunologischer Methode, wie z.B. ELISA, wo sie als Protein direkt detektiert werden, oder mittels PCR, wo spezielle DNA-Fragmente gemessen werden, zu bestimmen.

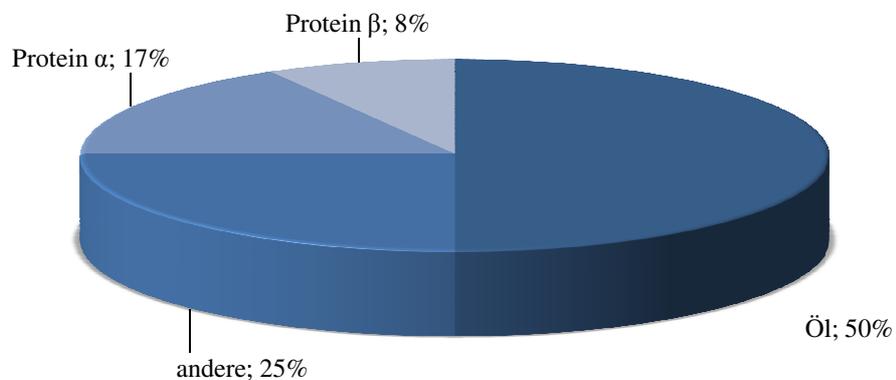


Abbildung 7: Zusammensetzung der Sesamsamen ohne Hülle

III. Experimenteller Teil:

QCM-Sensor basierend auf einem synthetischen Immunglobulin

III.1. Das Konzept

Ziel der Arbeit war die Herstellung künstlicher Antikörper aus Polymeren.²⁰ Dabei wird die spezifische Bindung zwischen Antikörper und Antigen ausgenutzt, um die sensitive Schicht der QCM-Sensor herzustellen. Es wurde zuerst ein Abdruck des Immunglobulins (Ig Y zur Bestimmung von Sesamproteine) auf Nanopartikeln erzeugt. Nach dem Aushärten wurde das Templat ausgewaschen. Auf dem Transducer befindliche Polymerschicht wird mit diesen Partikeln geprägt. Dadurch entstehen positive Abdrücke der Immunglobuline auf der Transduceroberfläche.²¹

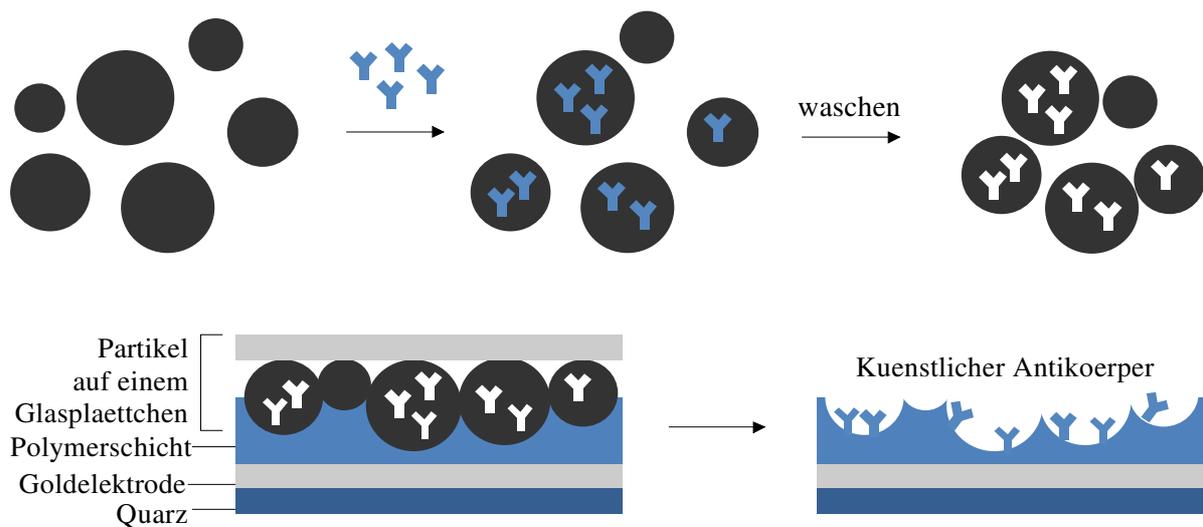


Abbildung 8: Herstellung Nanopartikel mit Abdruck von natürlichen Immunglobuline

Die Nanopartikeln haben aufgrund ihrer geringen Größe eine kleine Wechselwirkungsfläche zum Polymer. Dadurch ist es leicht, die Stempel wieder von der Polymerschicht zu trennen. Durch das Prägen, wird die Struktur von Nanopartikeln auf der Polymerschicht übertragen. Es ist insgesamt eine größere Gesamtoberfläche und somit mehr Bindungsmöglichkeiten für Analyten da.

III.2. Herstellung der Partikel

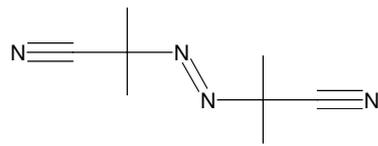
Die Nanopartikel wurden mittels Präzipitationspolymerisation hergestellt.²² Für diese spezielle Anwendung hat sich ein Copolymer aus Acrylsäure (acrylic acid) und Vinylpyrrolidon (vinyl pyrrolidone) bewehrt. Alle Komponenten (Tabelle 1) mit Ausnahme des Radikalstarters wurden mit 800 µl Wasser versetzt und kurz bei 70 °C erhitzt, bis der Quervernetzer sich vollständig gelöst hat. Danach wurde die Lösung mit KOH auf pH 7 gebracht und mit dem Radikalstarter Kaliumperoxidisulfat versetzt. Für die geprägten Partikel wurden Antikörper zu der Polymermischung zugegeben. Die Antikörper wurde zunächst vom Lösungsmittel befreit, und danach in entsprechende Mengen Polymermischung gelöst. Beide Teile der Mischung (mit und ohne Antikörper) wurden unter UV-Licht bis zum Gelpunkt vorpolymerisiert. Der Starter wirkt stark oxidierend und kann in hoher Konzentration den Antikörper denaturieren. Deshalb ist es wichtig, den Starter verdünnt in Lösung zuzugeben. Die Polymerisation dauert etwa 30 Minuten und verläuft bei dem reinen Präpolymerisat etwas schneller als mit dem Antikörper, da die Ordnung im reinen Präpolymerisat weniger gestört ist und im gleichen Volumen mehr Monomermoleküle vorhanden sind.

60 mg	DHEBA (Quervernetzer)
50 mg	Methacrylsäure
20 mg	Vinylpyrrolidon
1,5 mg	Kaliumperoxidisulfat (Radikalstarter)

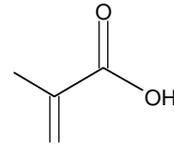
Tabelle 1: Zusammensetzung des verwendeten Polymers

Für die Präzipitationspolymerisation wurde ein Lösungsmittel vorgelegt, in der sowohl das Präpolymerisat, als auch das Copolymerprodukt nicht oder nur sehr schlecht löslich ist. Im Fall des Polyvinylpyrrolidon-polymethacrylsäure-Copolymeres wurde Acetonitril als Lösungsmittel verwendet. Beim heftigen Rühren wurde das Präpolymerisat in Lösung gebracht und über Nacht polymerisiert. Die Größe und Beschaffenheit der Partikel wurde mittels AFM überprüft.

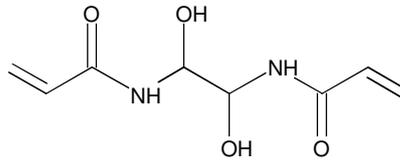
Partikel sind in der Größenordnung zwischen 100 und 600 nm. Die Größe der Partikel ist durch zwei Faktoren, das Verhältnis zwischen Präpolymerisat und Lösungsmittel und der Dauer der Vorpolymerisation, beeinflusst. Je höher die Konzentration der Präpolymerisat in Lösung ist, desto größer werden die Partikel.



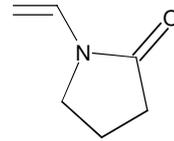
Azobisisobutyronitril



Methacrylsäure



DHEBA



Vinylpyrrolidon

Abbildung 9: Verwendete Komponenten

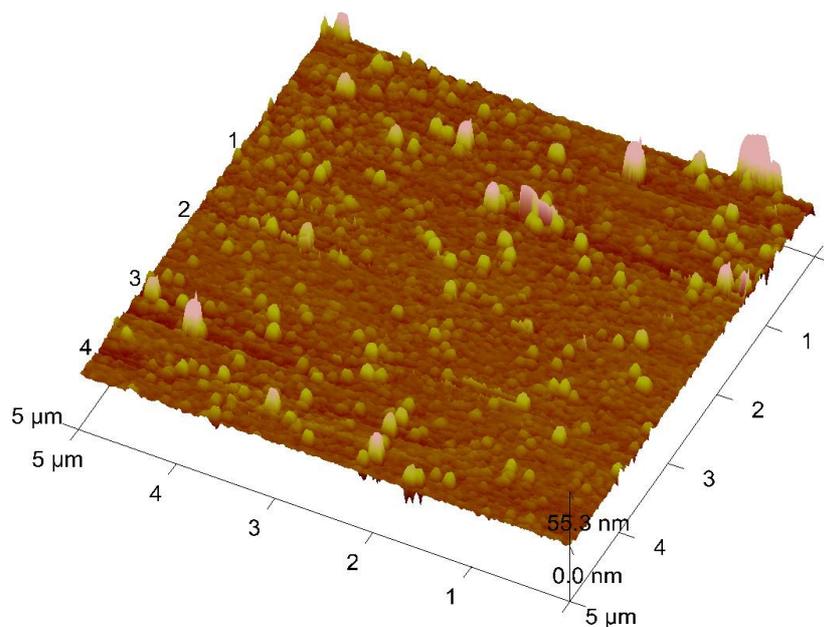


Abbildung 10: AFM-Aufnahme der Partikel auf Glas

III.3. Auswaschen der Antikörper

Die Reaktionsmischungen wurde zuerst zentrifugiert, dabei sedimentieren die Polymerpartikeln und der Überstand wurde entfernt. Um zu überprüfen, ob die Partikel vollständig abzentrifugiert wurden, wurde der Überstand mit AFM

gemessen. Dazu wurde die Lösung auf ein Glasplättchen gebracht und getrocknet. Mit Hilfe vom AFM konnte sicher gestellt werden, dass der Überstand frei vom Polymerpartikeln war. Nach dem Dekantieren wurde der Rückstand zwei Mal mit Wasser gewaschen. Dabei wurde die wässrige Lösung kurz im Ultraschallbad beschallt, bis die eventuell vorhandene weiße Rückstände in Lösung geht. Danach wieder zentrifugiert und den Überstand entfernt. Nach dem zweiten Waschen waren keine festen Rückstände mehr vorhanden, so wurde nach dem Abzentrifugieren, Zweidrittel der Lösung vom Oben vorsichtig entfernt und mit Wasser aufgefüllt. Die so hergestellten Nanopartikel werden zur Prägung von Schwingquarze verwendet.

III.4. Aufbringen Goldelektrode auf Schwingquarze

Für diese Arbeit wurden Quarze mit zwei Elektroden verwendet. Die Messelektrode bindet die Analyten selektiv. Die Referenzelektrode dient dazu, unspezifische Effekte oder Frequenzänderungen, die durch Temperatur- oder Dichteänderungen entstehen, von den eigentlichen Messeffekten abzuziehen.²³

Die beiden Goldelektroden, eine Referenz- und eine Messelektrode, wurden mittels Siebdruck auf einen Schwingquarz gedruckt. Dazu wurde eine Maske mit der gewünschten Druckmuster hergestellt. Ein Sieb mit der Maschenweite von 21 µm wurde mit UV-Photolack beschichtet und 40 Sekunden über der Elektrodenvorlage belichtet. Der unbelichtete Lack wurde mit Wasser ausgewaschen.

Um die Goldelektroden auf den Quarz aufzubringen, wurde zuerst der Quarzblättchen richtig positioniert, das Sieb darüber fixiert und die Glanzgoldpaste (GGP 2093 der Firma Heraeus) aufgetragen und glatt abgezogen. Anschließend wurde das Gold 2 Stunden bei 400 °C eingebrannt, wobei organische Reste der Paste verbrannten.

Eventuell vorhandene Reste vom organischen Material können mit N-Methylpyrrolidon entfernt werden, indem die Quarze in Lösung über Nacht gerührt wurden.

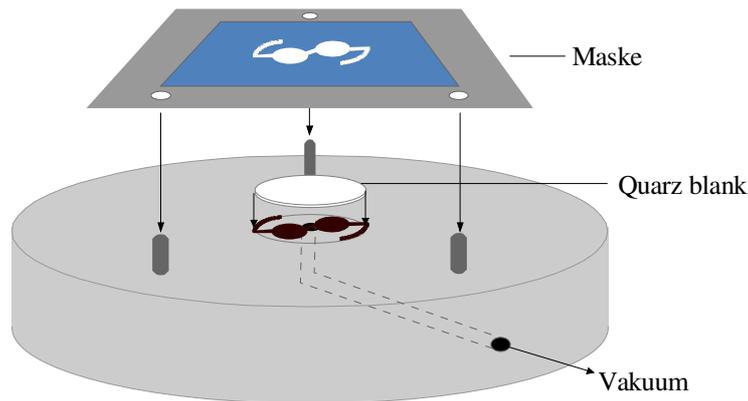


Abbildung 11: Aufbringen der Goldelektroden mittels Siebdruck

III.5. Mit Partikeln geprägte Schwingquarze

Zur Detektion von Sesamproteinen wurden die Messelektrode mit geprägten Partikeln und die Referenzelektrode mit ungeprägten Partikeln strukturiert.²⁴ Die Referenz ist notwendig, um unspezifische Effekte wie Viskositätsunterschiede oder Temperaturschwankungen zu kompensieren. Für die Prägung wurde zunächst ein Trägerpolymer hergestellt, das mittels Spincoating auf Quarz gebracht wurde und für die anschließende Prägung als Basis dient.²⁵

Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer

30 mg	DHEBA
50 mg	Methacrylsäure
20 mg	Vinylpyrrolidon
1,5 mg	AIBN (Radikalstarter)

Tabelle 2: Zusammensetzung des verwendeten Trägerpolymers

Alle Polymerkomponenten außer dem Starter wurden in 800 µl Wasser bei 70 °C gelöst. Danach wurde der Radikalstarter AIBN dazugegeben und bei 70 °C bis zum Gelpunkt vopolymerisiert. Dabei wurde die Polymerlösung trüb. Beim Erreichen des Gelpunktes wurde die Polymerlösung 1:2 mit Wasser verdünnt.

5 μ l der Polymerlösung auf beiden Elektroden verteilt und kurz bei 3000 rpm gespint, um eine gleichmäßig verteilte dünne Polymerschicht zu erzeugen. Dann wurden die Stempel mit Nanopartikeln drauf gedrückt, bevor das Polymer trocknet und mit Klammer fixiert.

Zur Herstellung der Stempel wurden ca. 20 μ l Partikelsuspension auf ein 5x5 mm Glasplättchen aufgetragen und getrocknet.

Durch Spincoating konnte dünne Polymerschicht von ca. 100 bis 200 nm Dicke hergestellt werden. Um die Schichtdicke zu bestimmen, wurde die Resonanzfrequenz des Quarzes vor und nach Auftragung der Polymerschicht verglichen. Frequenzunterschied von 1 kHz entspricht etwa Erhöhung der Schichtdicke von 40 nm.

Die Partikeln hinterlässt Ihr Abdruck im Trägerpolymer, zusätzlich sollen Partikeln mit negativem Abdruck vom Antikörper Abbildungen der Immunglobuline im Polymer erzeugen.

IV. Ergebnis und Diskussion

IV.1. Künstliche Antikörper zur Detektion von Sesamproteinen

Zu diesem Zweck wurden die Partikeln mit den Immunglobulinen-Y aus Hühnereiern geprägt. Pro ml Polymerlösung wurden 5,66 mg Antikörper verwendet.



Abbildung 12: Messzelle

Für die Messung wurde der Quarz in der Messzelle, bestehend aus PDMS- und Plexiglasteile, wie in Abbildung 12 dargestellt integriert. Die Plexiglas-Teile dienen als Halterung. Die in unterschiedliche Formen gegossenen PDMS-Teile erlauben je nach Anforderung eine Adaptierung des Volumens.

Je nach Messanforderung kann für eine stationäre Messung die Probe manuell injiziert oder mit Hilfe einer Pumpe im Durchfluss gemessen werden. In dieser Arbeit wurden alle Messungen stationär durchgeführt. Dabei wurde die Zelle zuerst mit Wasser durchgespült, um eventuell auf den Goldelektroden vorhandenen Reste der Nanopartikeln zu entfernen. Danach wurde mit bidestilliertes Wasser Grundfrequenz gemessen, dann die Probe injiziert. Bei Einlagerung von Sesamproteine wurde je nach Konzentration der Probe, Frequenzänderung in unterschiedlicher Höhe registriert.

Die Messzelle wurde über eine Oszillatorschaltung mit dem Frequenzzähler verbunden, und die vom Frequenzzähler registrierten Signale von einem Rechner digital erfasst.

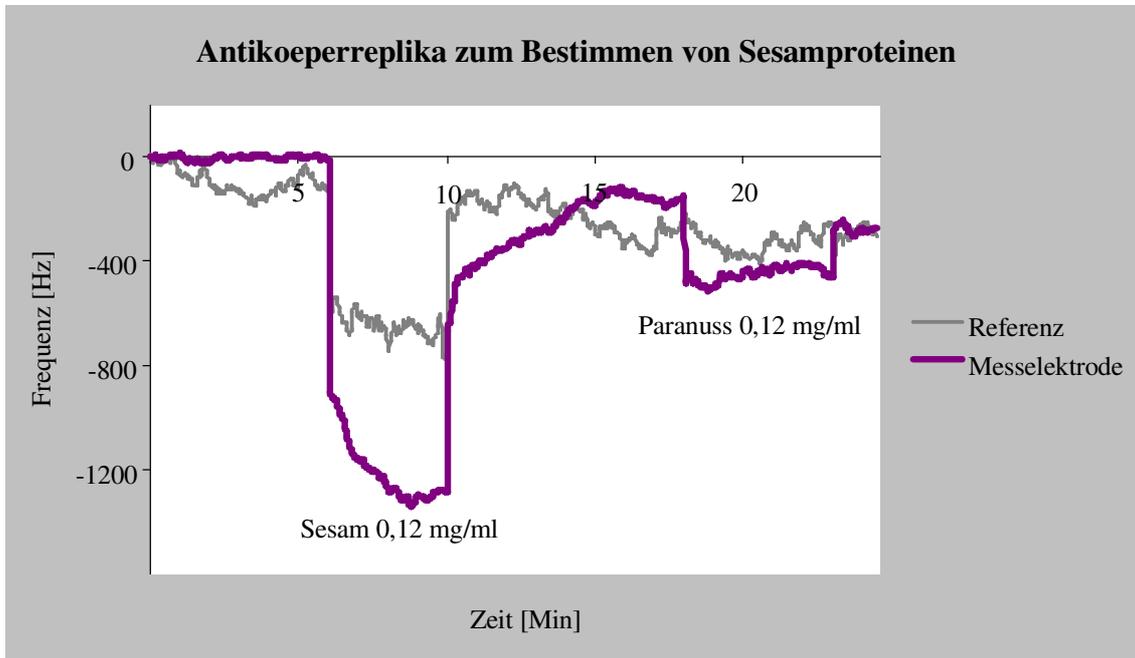


Abbildung 13: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden. Zum Vergleichen der Querempfindlichkeit Sesamproteinen zu Paranus-Proteinen wurden beide Proteine mit der gleichen Konzentration nacheinander injiziert. Die Frequenz sinkt beim Injizieren von Proteinen. Mit Wasser werden die Ausgangsfrequenzen wieder erreicht.

Es wird angenommen, dass der Antigen-Antikörper-Bindungseffekt auch zwischen künstlichen Antikörpern und Sesamproteinen vorhanden ist. Die Güte dieses Effektes wurde mittels QCM-Messung²⁶ überprüft. Dazu wurden Antikörperreplika wie im vorigen Kapitel beschrieben auf der Gold Elektrode eines Quarzes erzeugt und in eine Messzelle integriert. Die beiden Elektroden auf dem Quarz sind über die Oszillatorschaltung mit einem Frequenzzähler verbunden. Der Proberaum wurde zunächst mit Wasser gefüllt, um Grundfrequenzen der beiden Elektroden zu ermitteln. Danach wurde das Wasser entfernt und eine wässrige Lösung mit 0,12 mg/ml Sesamproteine injiziert. Dabei wurde Frequenzabnahme vom 1300 Hz (Abbildung 13) beobachtet. Der Messeffekt ist doppelt so groß wie bei der Messung mit Direktabdruck von Sesamproteinen (Abbildung 36).

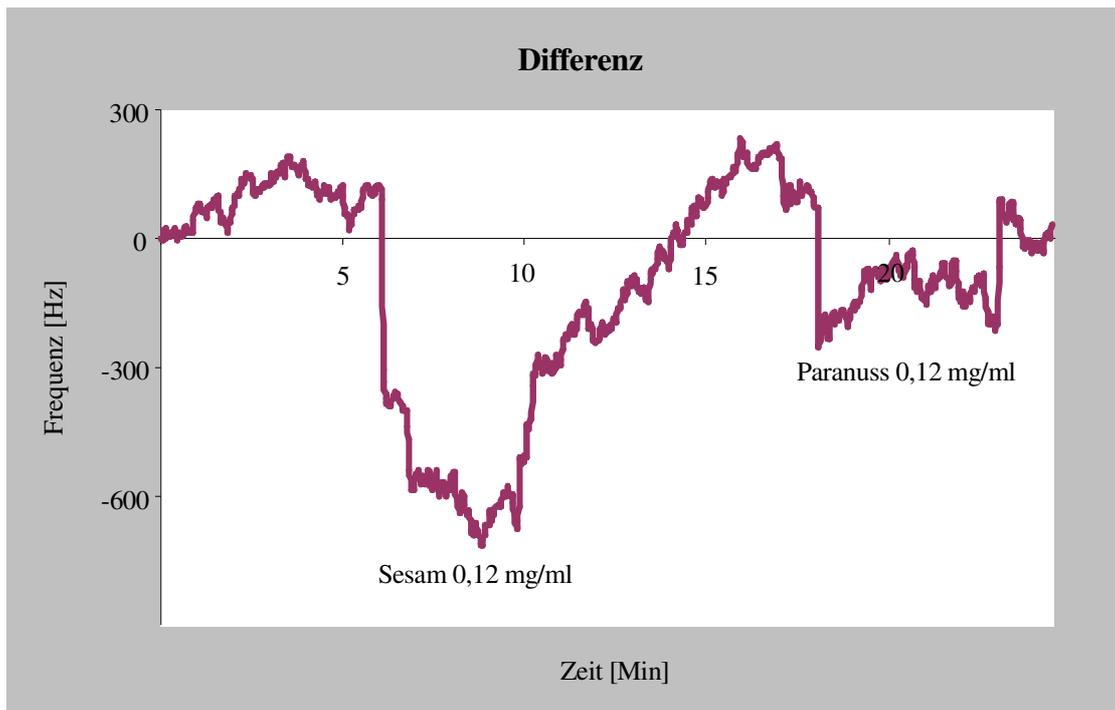


Abbildung 14: Differenzkurve der in Abbildung 13 Gezeigten Messkurve.

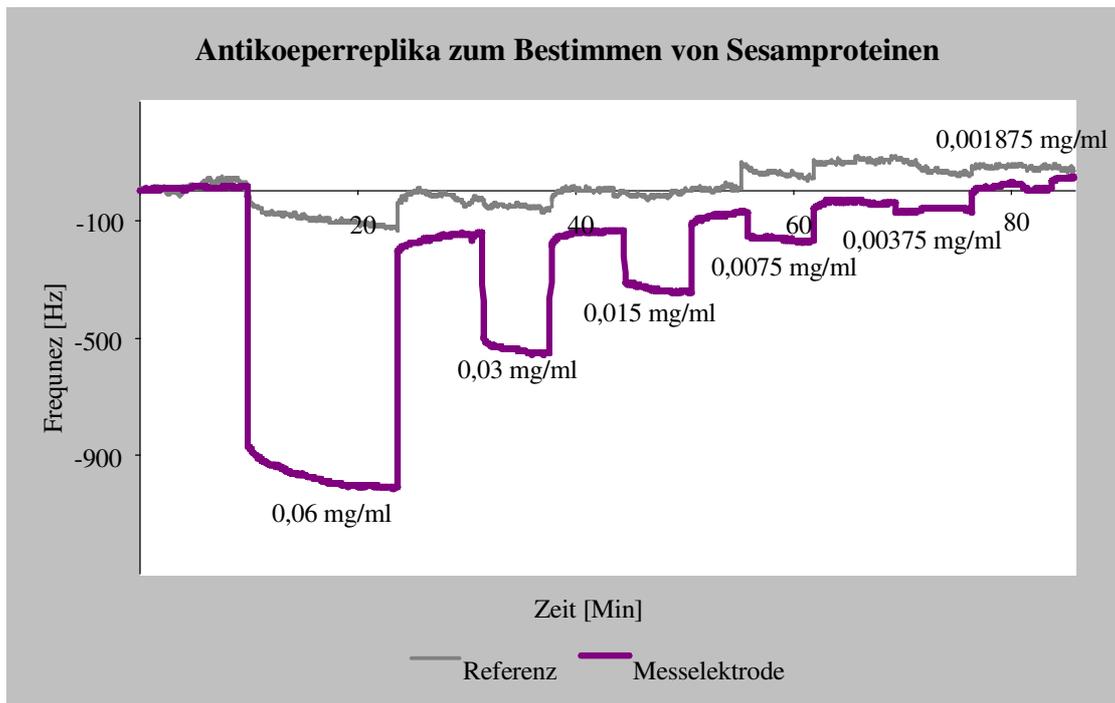


Abbildung 15: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden. Zur Ermittlung der Detektionsgrenze wurden Sesamproteine in absteigenden Konzentrationen injiziert. Die Frequenz sinkt beim Injizieren von Proteinen, welche beim Injizieren vom Wasser wieder zurück geht.

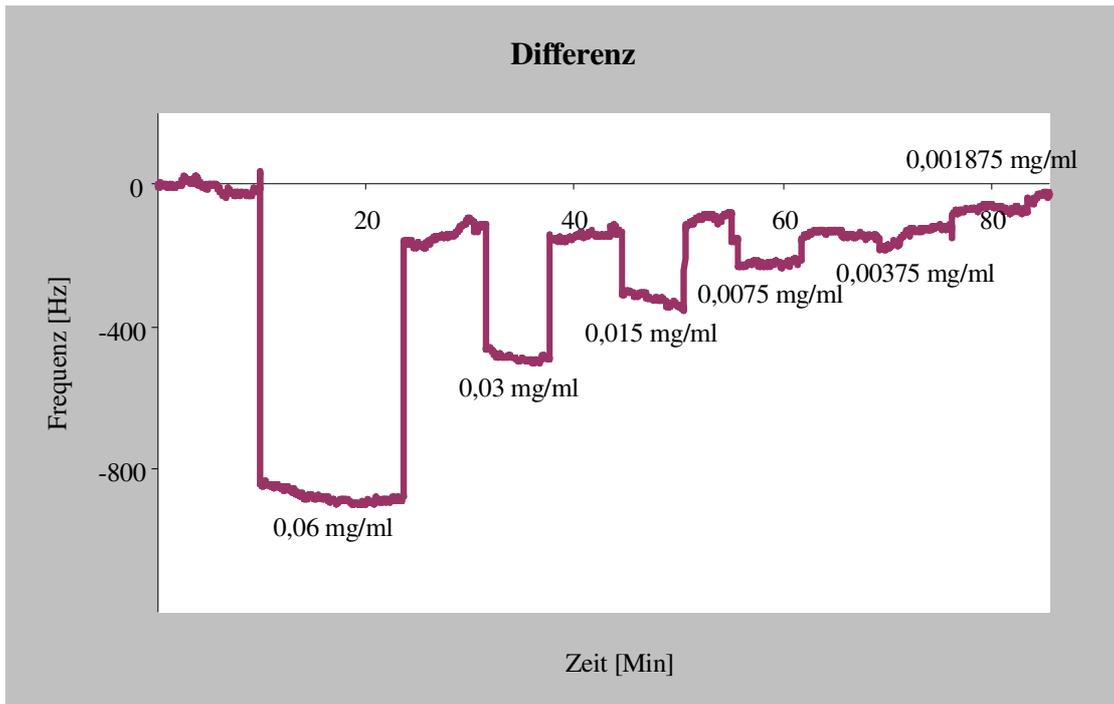


Abbildung 16: Differenzkurve der in Abb. gezeigten Messkurve

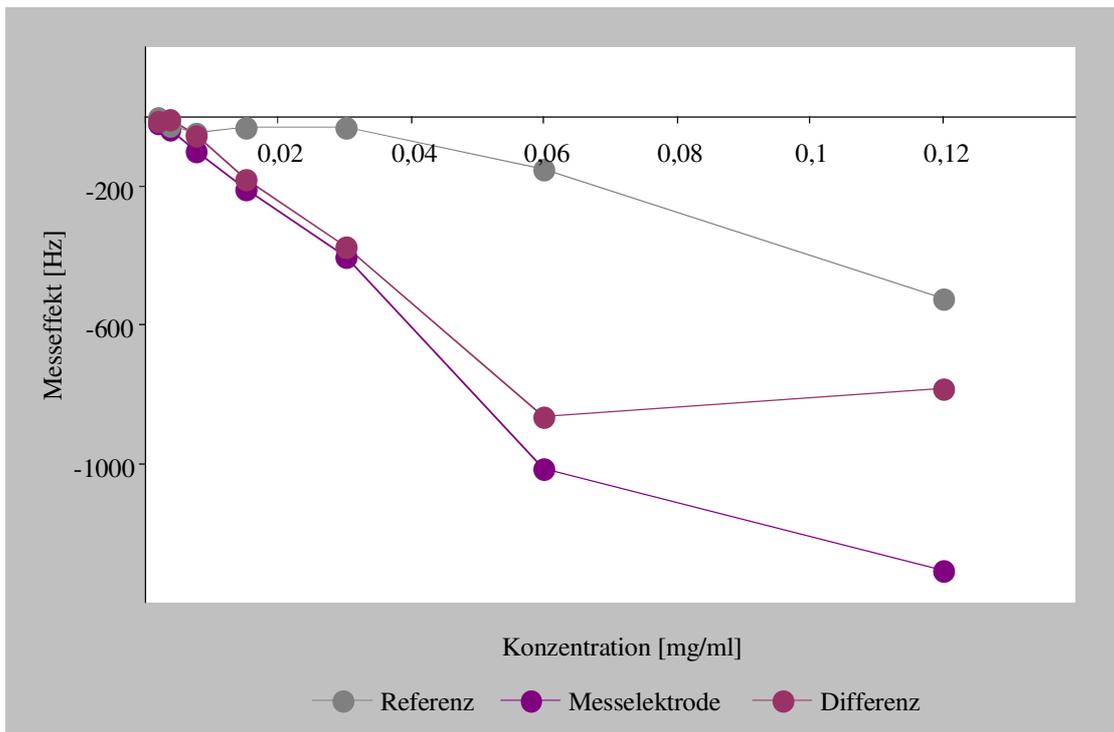


Abbildung 17: Kennlinie der künstlichen Immunglobuline mit Sesamproteinen, die aus Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, durch Prägen mit Partikeln, welche mit Sesamantikörpern geprägt wurden, hergestellt wurde.

Konzentration [mg/ml]	Messelektrode [Hz]	Referrenz [Hz]	Differenz [Hz]
0,12	-1309	-523	-786
0,06	-1015	-152	-863
0,03	-407	-31	-376
0,015	-207	-28	-179
0,0075	-99	-45	-54
0,00375	-35	-26	-9
0,001875	-19	-4	-15

Tabelle 3: Konzentrationsabhängigkeit des Messeffektes mit Antikörperreplika

Nach dem Erreichen des Gleichgewichtes (Signal-Plateau) wurde die Probelösung aus dem Proberaum entfernt und der Quarz mehrmals mit bidestilliertem Wasser gespült. Danach wurde Wasser injiziert, wo der Frequenz wieder zunahm. Anschließende Messung der wässrigen Lösung mit 0,12 mg/ml Paranusproteine zeigte eine viel niedrigere Frequenzabnahme im Vergleich zu der wässrigen Sesamproteinlösung mit der gleichen Konzentration.

Abbildung 15 und Abbildung 16 zeigen eine Messreihe der wässrigen Sesamproteinlösung mit absteigenden Konzentrationen. Ausgehend von der Probe mit 0,12 mg/ml Sesamprotein, wurden immer die 1:1-Verdünnung der vorigen Probe gemessen. Diese Messungen zeigen, dass die Frequenzabnahme von Konzentration der Sesamproteine abhängt. Das Detektionslimit liegt in dem Fall bei etwa 0,0019 mg/ml. Es ist um mehr als einer Zehnerpotenz kleiner als bei der Messung mit dem Sesamproteinabdruck (0,015 mg/ml).

Die Kennlinien der konzentrationsabhängigen Signaländerung zeigen, dass im Bereich der niedrigen Proteinkonzentration (bis zu 0,06 mg/ml Sesamproteine in Lösung) die Signaländerung annähernd linear ist. Bei der höheren Konzentration ist der Messeffekt (Tabelle 3) kleiner. Es kam zur Sättigung.

IV.1.1. Messungen zur Selektivität der Schichten

Um die Selektivität der Antikörperrepliken zu überprüfen, wurden verschiedene Proteinlösungen mit der gleichen Konzentration (0,12 mg/ml Proteine) nacheinander injiziert und gemessen. Außer den bereits in Abbildung 13: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden.

Zum Vergleichen der Querempfindlichkeit Sesamproteinen zu Paranuss-Proteinen wurden beide Proteine mit der gleichen Konzentration nacheinander injiziert. Die Frequenz sinkt beim Injizieren von Proteine Abbildung 13 und Abbildung 14 zeigten Sesam- und Paranusproteinen, wurden zusätzlich noch Protein-lösungen von Haselnuss, Mohn und Mandel gemessen. Dabei sollte der Sensor möglichst nur die Sesamproteine selektiv einlagern.

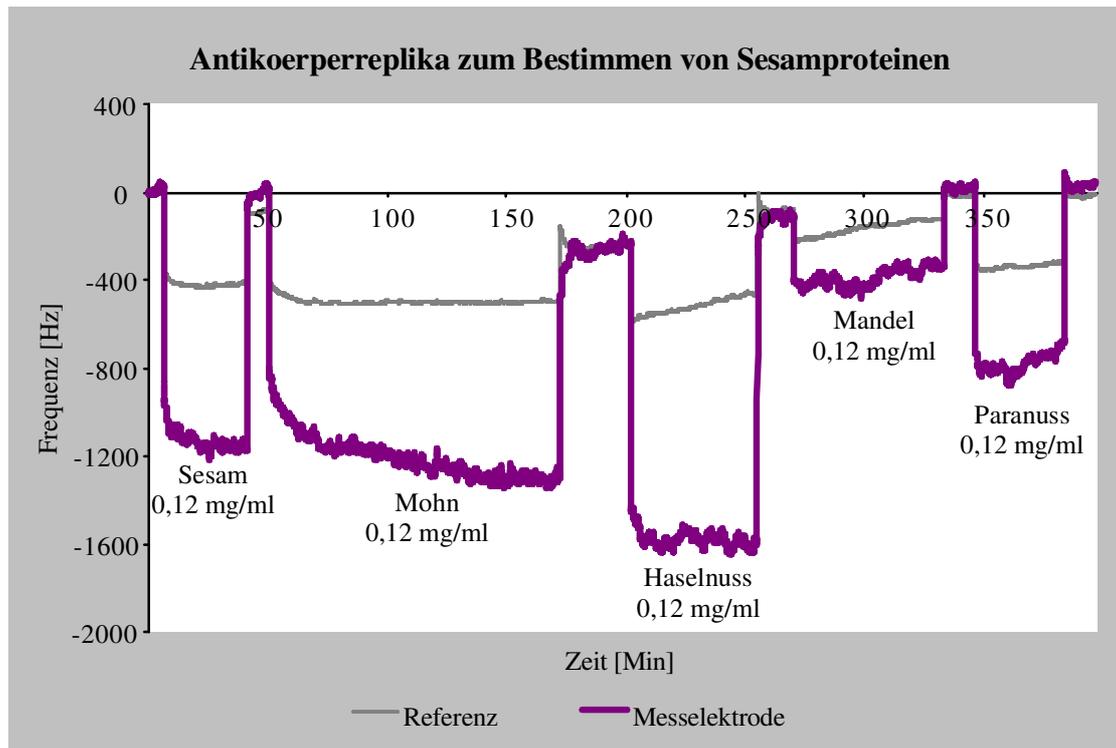


Abbildung 18: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern strukturiert wurden. Der Antikörperverbrauch wurde um 1/5 erhöht. Zur Ermittlung der Querempfindlichkeit wurden Proteine der unterschiedlichen Lebensmittelproben mit der gleichen Konzentration nacheinander injiziert. Die Frequenz sinkt beim Injizieren von Proteinen, welche beim Injizieren vom Wasser wieder zurück geht.

Die Messungen mit den verschiedenen Lebensmittelproteinen zeigen ähnliche Querempfindlichkeit wie bei der Sensorschicht aus Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, der direkt mit Sesamproteinen geprägt wurde (Abbildung 42 und Abbildung 43). Die hohe Querempfindlichkeit der Sesamproteine mit Haselnuss- und Mohnproteine können damit erklärt werden, dass die Oberflächenbeschaffenheit dieser Proteine die der Sesamproteine sehr ähnliche sind. Der große Messeffekt bei der Paranus im Vergleich zu der

vorherigen Messung (Abbildung 13 und Abbildung 14) ist wahrscheinlich auf Alterung der Probe zurückzuführen.

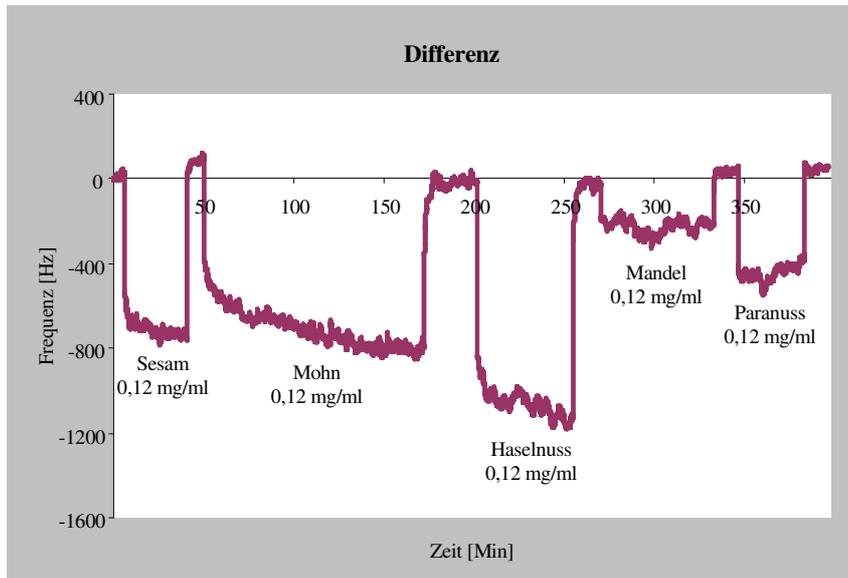


Abbildung 19: Differenzkurve der in Abbildung 18 gezeigten Messkurve

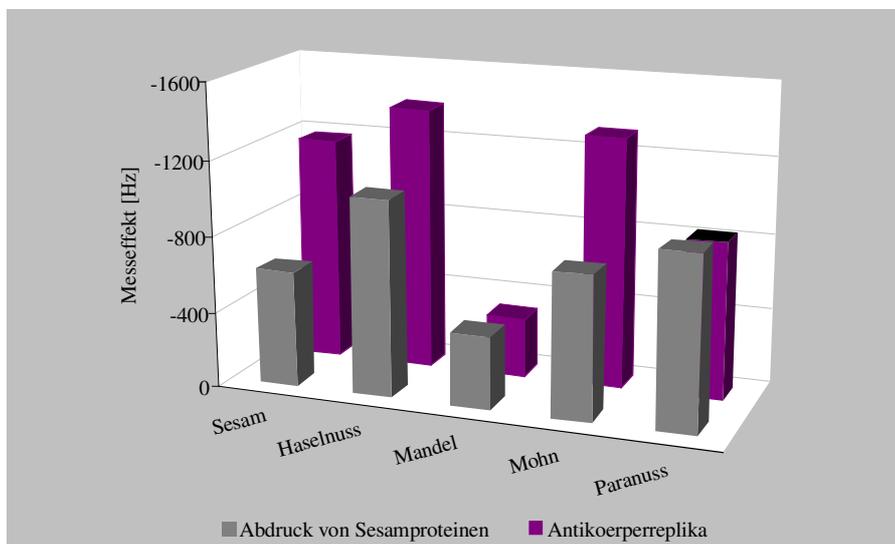


Abbildung 20: Vergleich der Messeffekt in der Querempfindlichkeit: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Sesamproteinen.

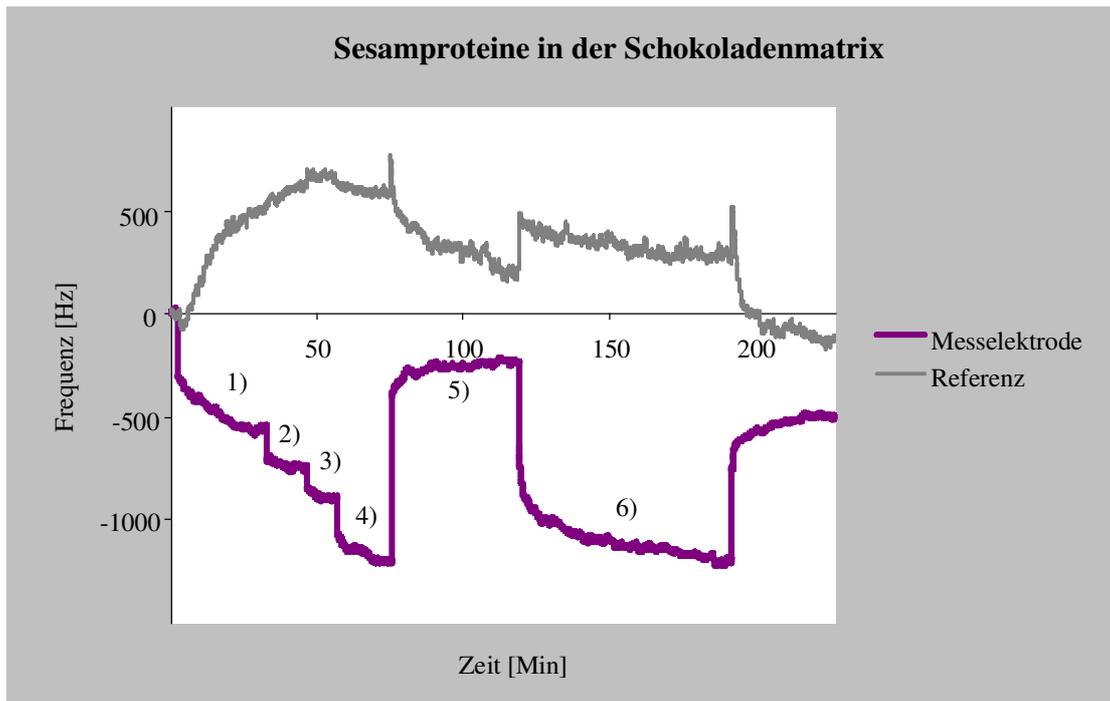


Abbildung 21: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden. 1:100 verdünnte Schokoladenextrakte mit steigenden Konzentrationen von Sesamproteinen (1) 0 mg/ml, 2) 0,03 mg/ml, 3) 0,06 mg/ml, 4) 0,12 mg/ml) wurden direkt nacheinander gemessen. Zwischen den einzelnen Konzentrationen wurde keine Messung mit Wasser durchgeführt. Zum Vergleich wurde anschließend Wasser (5) und danach Sesamproteine (6) in wässrige Lösung mit der Konzentration von 0,12 mg/ml gemessen. Die Frequenz sinkt beim Injizieren von Proteinen, welche beim Injizieren vom Wasser wieder zurück geht.

Es wurde als Ziel gesetzt, dass der künstliche Antikörper für die Messung in realen Lebensmittelproben verwendet werden soll. Relevante Proben sind Nahrungsmittel, wie z.B. Vollkornbrot oder Kekse, wo Sesams in Spuren enthalten können. Als Vorbereitung für die Messung in realen Proben wurden Querempfindlichkeiten mit anderen Bestandteilen der Proben und Sesamproteine in diesen Bestandteilen (als vereinfachte Matrix). Für Messungen in besonders komplizierten Matrices ist es notwendig, die Matrixlösung zu verdünnen. Die Verdünnung ist abhängig von der Probe, empirisch zu ermitteln. Wenn es Fett- bzw. Ölreste oder ungelöste Feststoffe in der Probe vorhanden sind, sollte diese vor der Messung abzentrifugiert werden, weil diese Verunreinigungen auf Elektroden sedimentieren und die Messung erheblich

stören können. Zu den wichtigen Störungsfaktoren zählen auch besonders hohe Viskositäten und hohe Ionenkonzentrationen.

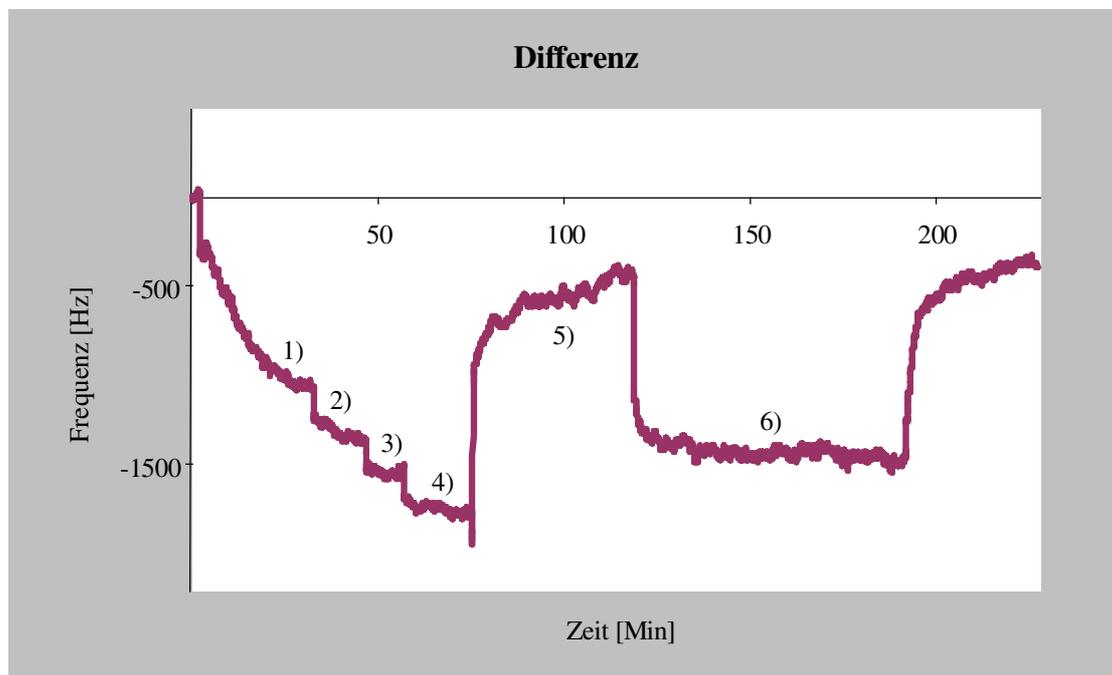


Abbildung 22: Differenzkurve der in Abbildung 21 gezeigten Messkurve: 1) Schokoladenextrakte, 1:100 verdünnt, 2) Schokoladenextrakte mit 0,03 mg/ml Sesamproteinen, 3) mit 0,06 mg/ml Sesamproteinen, 4) mit 0,12 mg/ml Sesamproteinen, 5) Wasser, 6) 0,12 mg/ml Sesamproteine in wässriger Lösung

Abbildung 21 und Abbildung 22 Zeigen Messungen mit Schokoladenextrakte als Matrix. Die Matrix-Lösung wurde 1:100 verdünnt. Für die Messung wurde die reine Schokoladenextrakt und Schokoladenextrakt mit steigender Sesamproteinkonzentration (0,03/0,06/0,12 mg/ml) nacheinander injiziert. Die reine Schokoladenextrakt verursacht eine Frequenzabnahme von ca. 600 Hz. Mit steigender Sesamkonzentration nahm die Signalabnahme zu. Bei der Konzentration von 0,12 mg/ml Sesamprotein ist der Messeffekt gleich groß wie die reine Sesamprobe mit der gleichen Konzentration.

IV.1.2. Einfluss des Antikörperverbrauchs auf dem Messeffekt

Theoretisch können sich umso mehr Analyten auf der Goldelektrode mobilisieren, je mehr Antigen-Bindungsstelle auf den Nanopartikeln vorhanden ist. Dadurch steigt der Messeffekt und die Detektionsgrenze wird kleiner. Tatsächlich spielen viele Faktoren wie z.B. die Größe der Partikeln, der Abstand

und Geometrie der Antigen-Bindungsstelle usw. eine Rolle, wie gut die Nanopartikeln für die Messung von Sesamproteinen geeignet sind. Um die optimale Antikörpermenge, die zur Herstellung der Antikörperrepliken eingesetzt wird, zu finden, wurde ausgehend vom bisherigen Verbrauch (56,6 µg Antikörper pro ml Polymermischung) die Einsatzmenge schrittweise reduziert bzw. gesteigert. Dabei wurde immer getestet, wie stark sich die Messeffekte dadurch ändern würden.

Sowohl bei der Reduktion, als auch bei der Erhöhung der Antikörperverbrauch wurden kleineren Messeffekte (Abbildung 29) beobachtet. Vergleicht man die Messeffekte bei der Konzentration von 0,12 mg/ml Sesamproteinen, ist der Messeffekt bei Reduktion der Antikörperverbrauch um 1/5 um 30 % und bei Reduktion um 2/5 schon um 80 % kleiner. Beim erhöhten Antikörperverbrauch um 1/5 ist der Messeffekt etwas (ca. 10 %) kleiner.

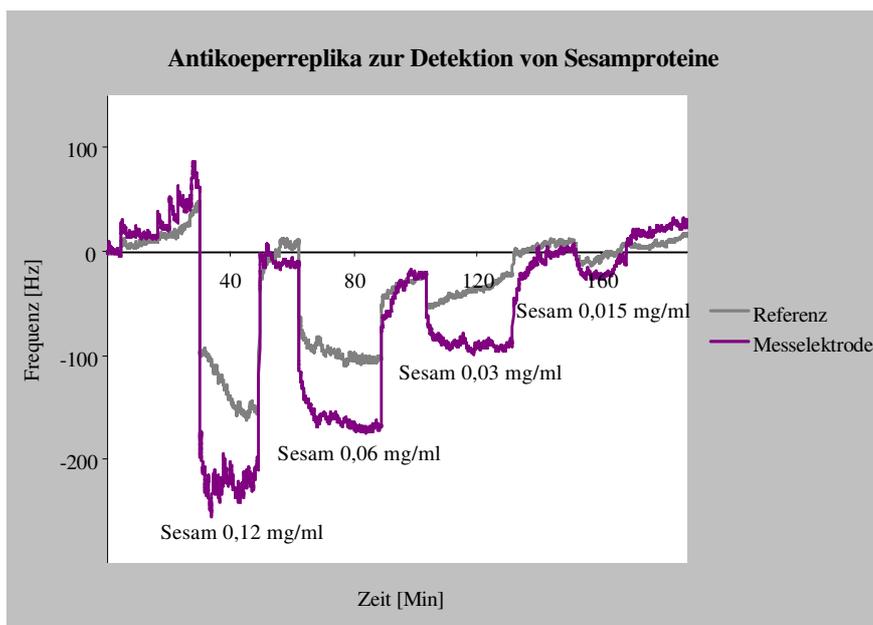


Abbildung 23: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden. Der Antikörperverbrauch wurde um 2/5 reduziert. Zur Ermittlung der Detektionsgrenze wurden Sesamproteine in absteigenden Konzentrationen injiziert. Die Frequenz sinkt beim Injizieren von Proteinen, welche beim



Abbildung 24: Differenzkurve der in Abbildung 23 gezeigten Messkurve

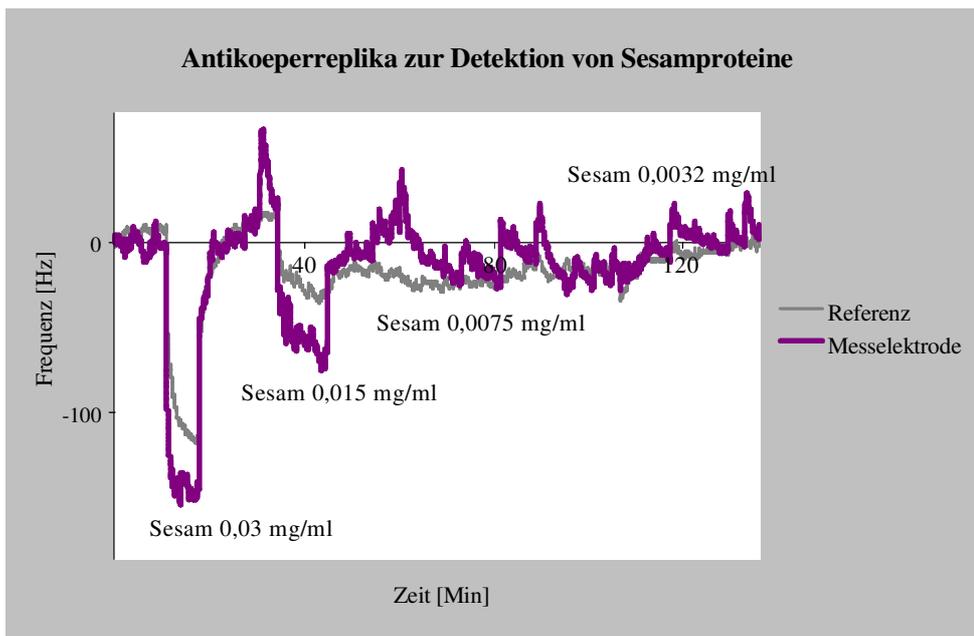


Abbildung 25: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden. Der Antikörperverbrauch wurde um 2/5 reduziert. Messung der kleinen

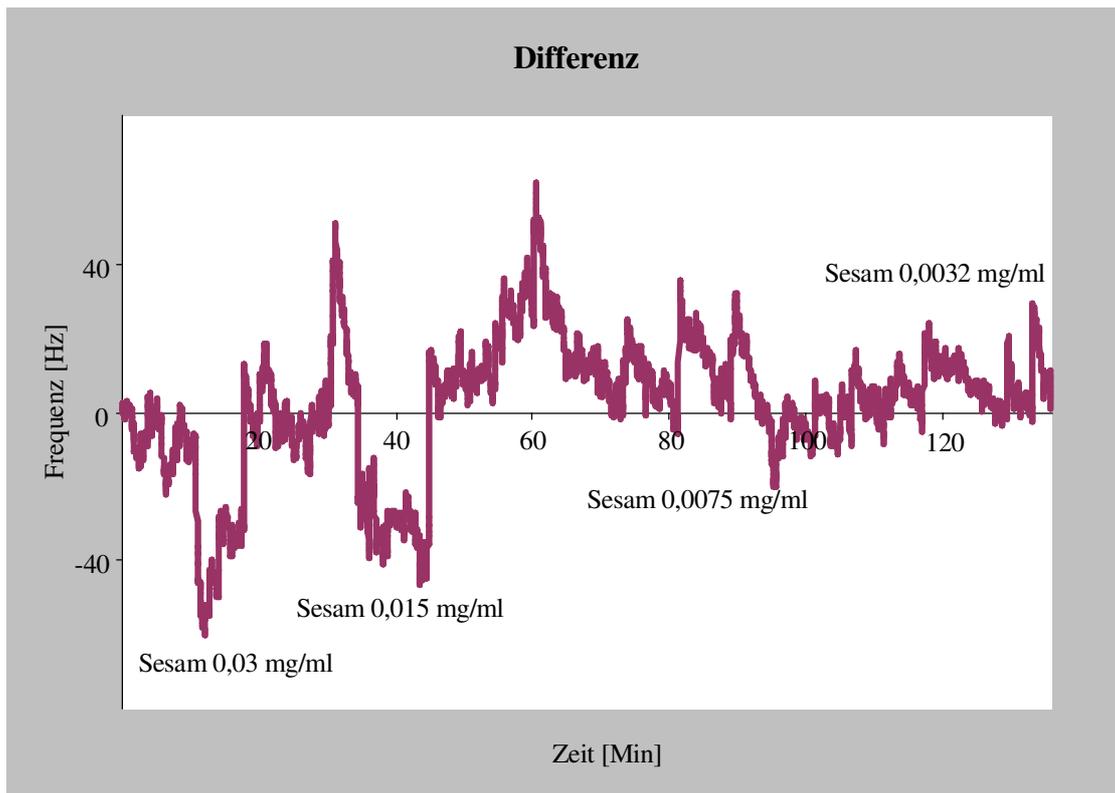


Abbildung 26: Differenzkurve der in Abbildung 25 gezeigten Messkurve

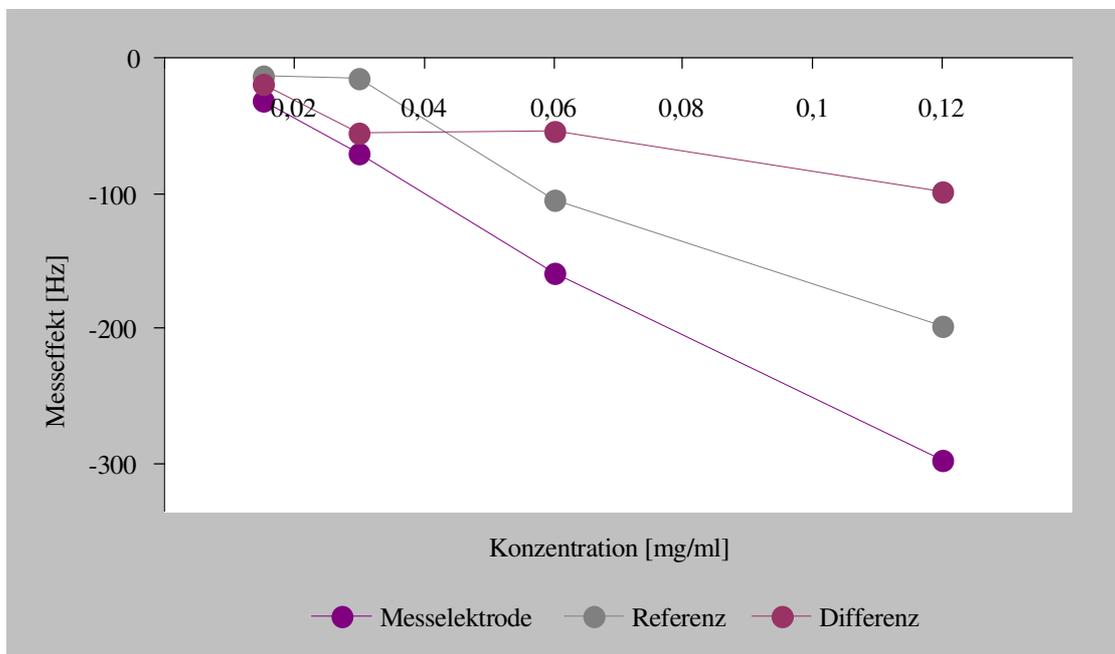


Abbildung 27: Kennlinie der künstlichen Immunglobuline mit Sesamproteinen, die aus Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, durch Prägen mit Partikeln, welche mit Sesamantikörpern geprägt wurden, hergestellt wurde.

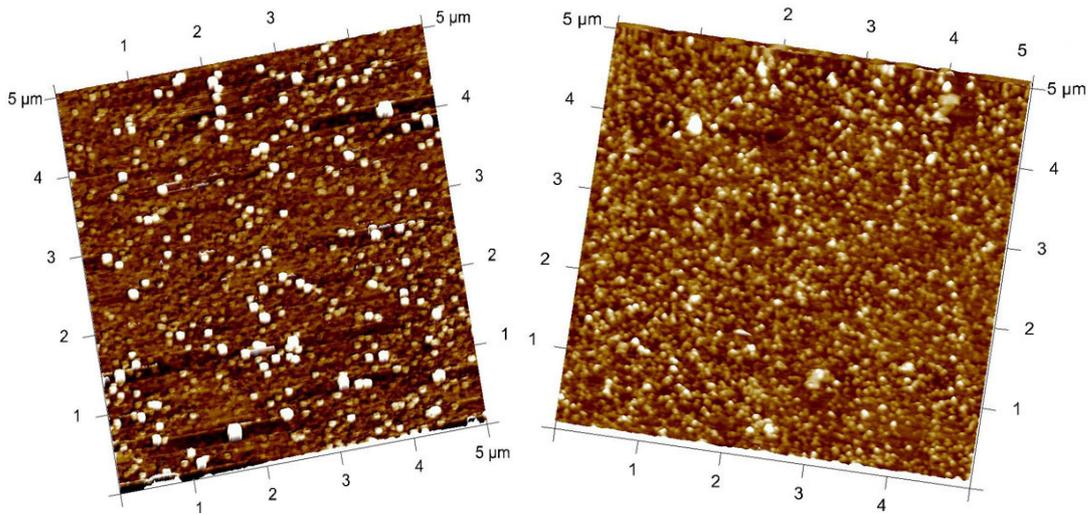
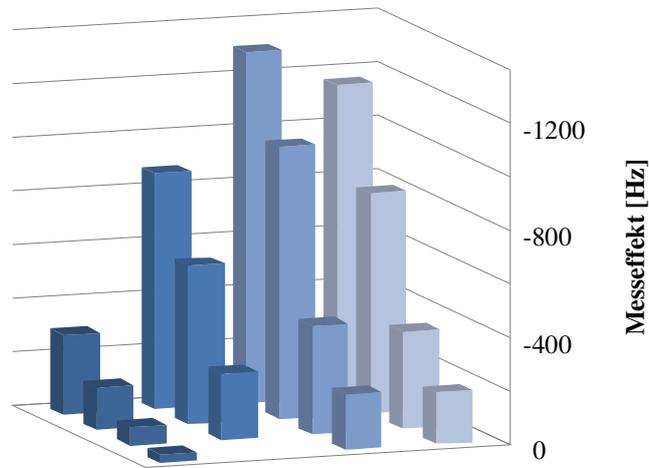


Abbildung 28: AFM-Aufnahme zeigen Einfluss der Antikörpermenge auf Partikelgröße bei gleich langer Reaktionszeit. Links: 5,66 mg Antikörper pro ml Polymer-Mischung. Rechts: 6,79 mg Antikörper pro ml Polymer-Mischung.



Konzentration [mg/ml]	120	60	30	15
■ Reduktion auf 3,40	-297	-159	-70	-32
■ Reduktion auf 4,53	-878	-594	-249	
■ Standardmenge 5,66	-1309	-1015	-406	-207
■ Erhöhung auf 6,80	-1167	-820	-363	-192

Abbildung 29: Messeffektänderung beim Variieren vom Antikörperverbrauch

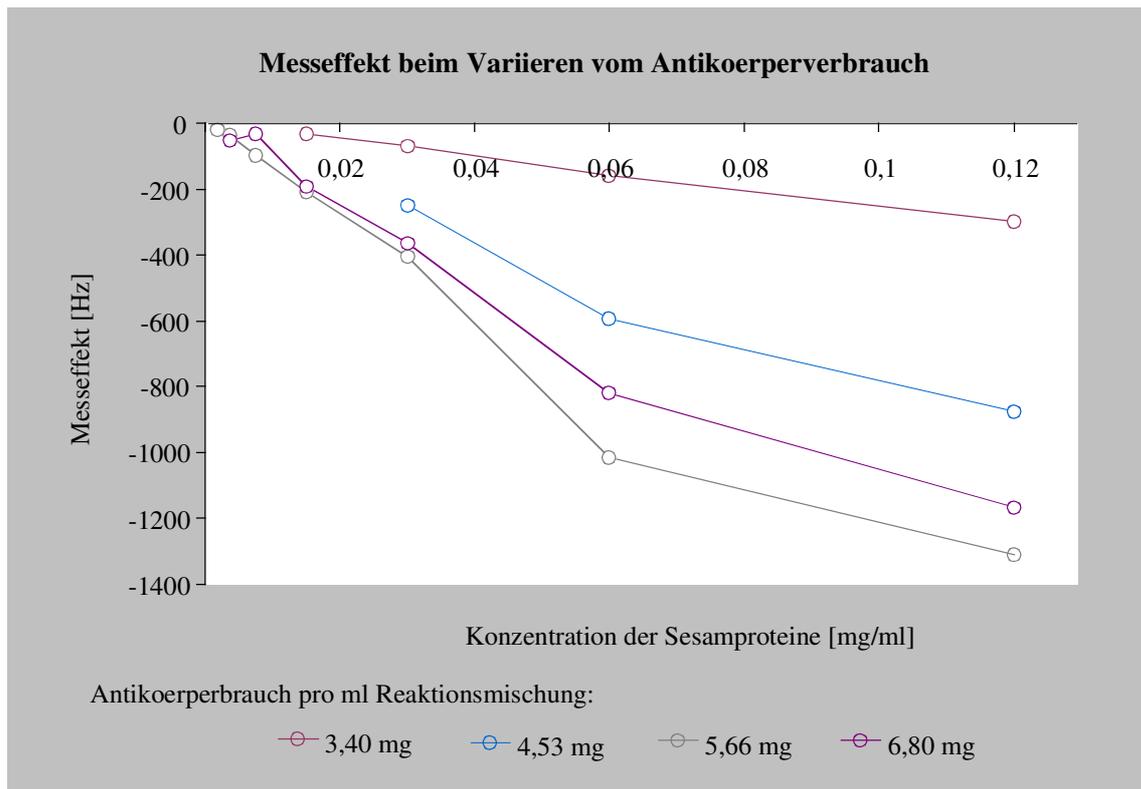


Abbildung 30: Kennlinie der künstlichen Immunglobuline mit Sesamproteinen, die aus Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, durch Prägen mit Partikeln, welche mit unterschiedlichen Mengen von Sesamantikörpern geprägt wurden, hergestellt wurde.

Abbildung 23 bis Abbildung 26 zeigen Messungen mit Antikörperrepliken, bei deren Herstellung der Antikörperverbrauch um 2/5 reduziert wurde. Die Detektionsgrenze liegt bei 0,015 mg/ml und ist um mehr als ein Zehnerpotenz kleiner als bei den Antikörperrepliken, die mit 5,66 mg/ml Antikörper hergestellt wurden. Bei den nächsten kleineren Konzentrationen wurden zwar Messsignale registriert, allerdings waren sie in der gleichen Größenordnung wie Referenzsignale. Die Kennlinie der Messung (Abbildung 27) ist linear.

Wie angenommen, wurde der Messeffekt durch die Reduktion vom Antikörperverbrauch kleiner. Demnach sollte der Messeffekt durch die Erhöhung vom Antikörperverbrauch aber größer werden. In den Abbildung 32 und Abbildung 33 sind Messungen mit Antikörperrepliken dargestellt, bei deren Herstellung 1/5 mehr Antikörper verwendet wurde. Im Vergleich zu den ursprünglichen Messungen (Abbildung 13 bis Abbildung 16) ist der Messeffekt kleiner geworden. Ursache für den kleineren Messeffekt könnte sein, dass die Synthese der Nanopartikeln durch die erhöhten Antikörper-Anteile in der

Polymer-Mischung gestört wurde. Bei der Synthese der Nanopartikeln sind es für die Größe der Partikeln das Mischungsverhältnis der einzelnen Komponenten und die Reaktionszeit die entscheidenden Faktoren. Je hoch der Fremdstoffanteil (Anteil der Antikörper) in der Polymer-Mischung ist, desto länger braucht die Reaktionsmischung, um eine bestimmte Größe zu erreichen. Durch den Fremdstoffanteil in der Reaktionsmischung sind die Monomeren in ihre Reaktion zur Bildung des Polymers verlangsamt. Abbildung 28 zeigt AFM-Aufnahmen von Nanopartikeln unterschiedlicher Größen. Das linke Bild ist eine Aufnahme von Nanopartikeln, die mit 5,66 mg Antikörper pro ml Polymer-Mischung hergestellt wurden. Großteil der Partikeln haben eine Durchmesser zwischen 100 und 200 nm. Auf dem rechten Bild sind Nanopartikeln abgebildet, die mit 6,80 mg Antikörper pro ml Polymer-Mischung hergestellt wurden. Die meisten Partikeln haben weniger als 100 nm in der Durchmesser.

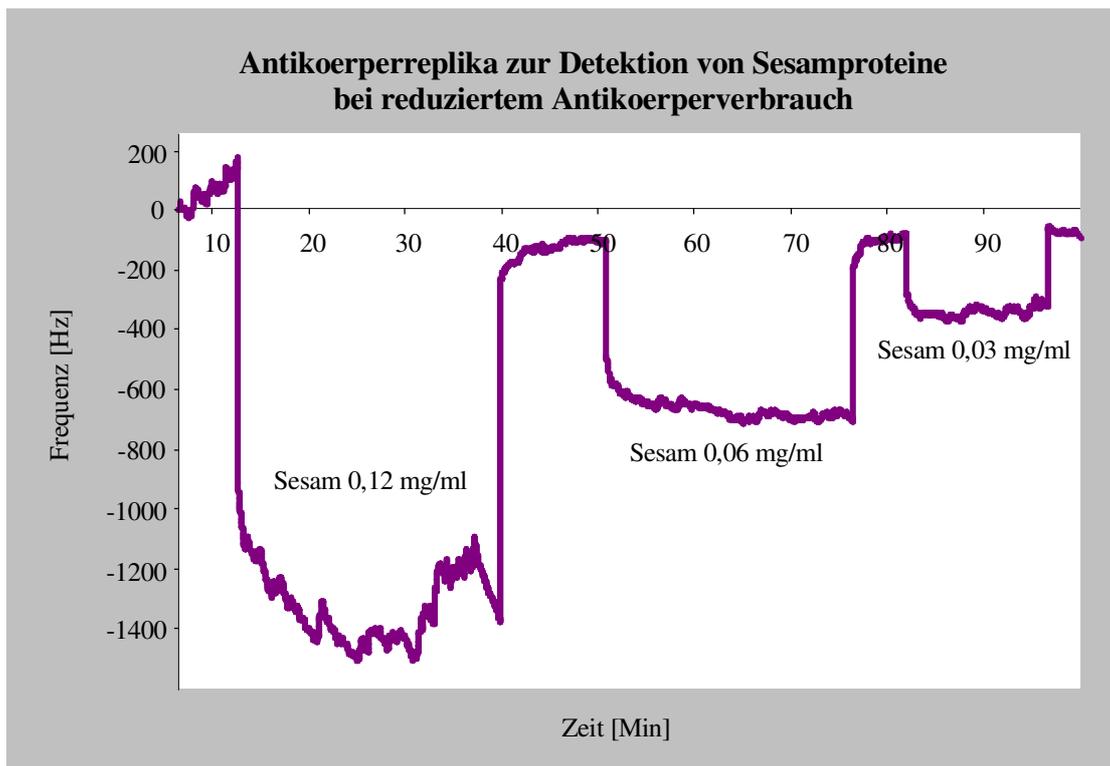


Abbildung 31: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden. Der Antikörperverbrauch wurde auf 4,53 mg/ml reduziert.

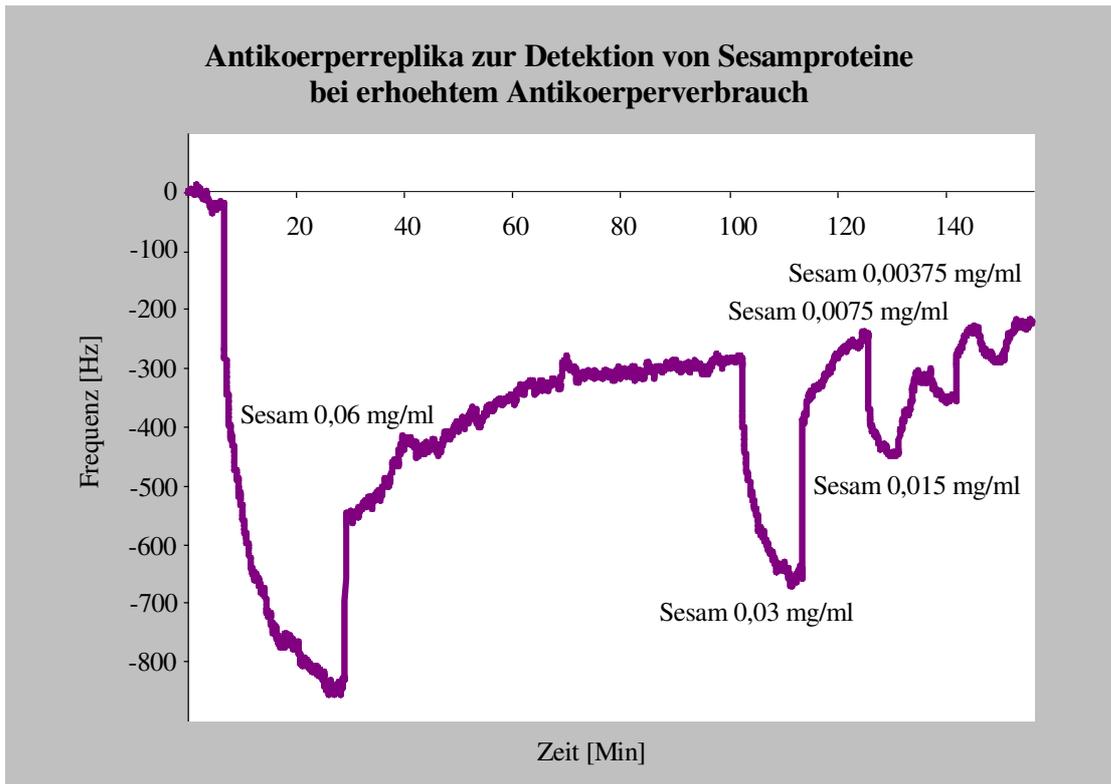


Abbildung 32: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Partikeln, die mit Sesamantikörpern geprägt wurden. Der Antikörperverbrauch wurde auf 6,80 mg/ml erhöht.

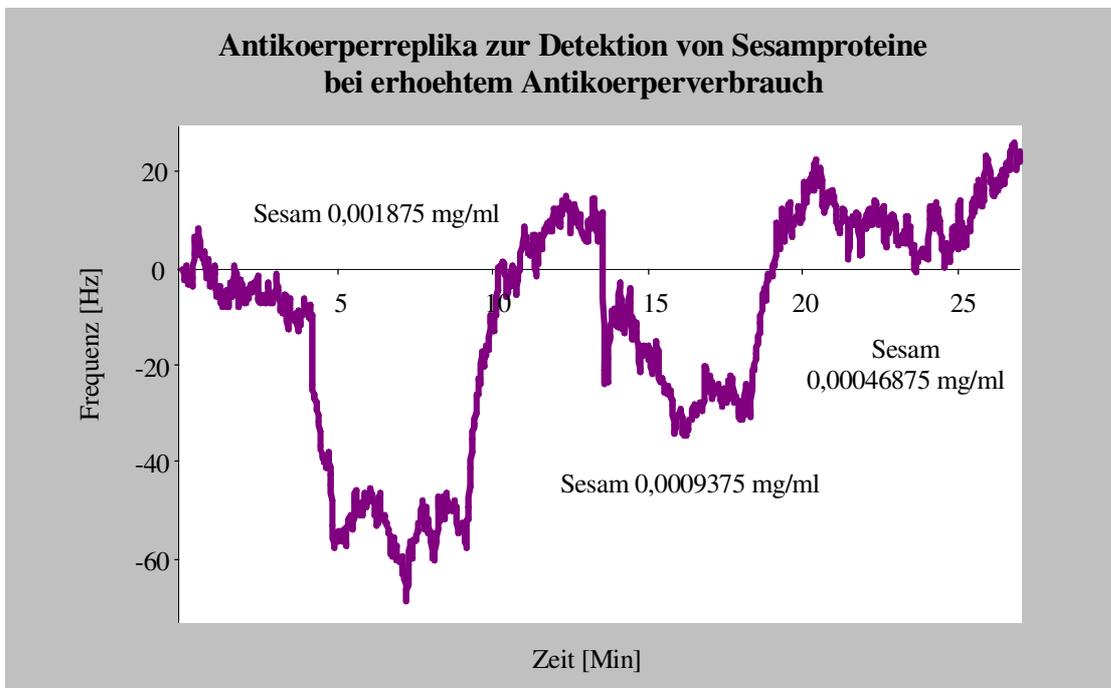


Abbildung 33: Fortsetzung der in Abbildung 32 gezeigten Messung mit kleinen Konzentrationen

IV.2. Natürliche Antikörper zur Detektion von Sesamproteine

Um die Güte der Antigen-Antikörper-Bindungseffekt zwischen dem natürlichen Sesamantikörper und der Sesamproteine zu überprüfen, wurden QCM-Messungen mit dem natürlichen Sesamantikörper, der direkt auf den Goldelektroden mobilisiert wurde, durchgeführt. Der natürliche Antikörper Immunglobulin Y wurde aus Hühnerei, das gegen Sesamproteine immunisiert wurde, gewonnen. Der Antikörper hat eine ursprüngliche Konzentration von 45,3 mg/ml. Für die Messung wurde der Antikörper auf 1 mg/ml mit bidestilliertem Wasser verdünnt und direkt in den Proberaum injiziert. Dort befand sich ein Quarz mit nackten Goldelektroden. Nach ca. 10 Minuten wurde die Antikörperlösung entfernt und der Quarz mit bidestilliertem Wasser gewaschen (Abbildung 34, *). Der so hergestellte Quarz kann mehrere Tage lang für die Messung verwendet werden. Für die Aufbewahrung wurde PDS-Puffer verwendet.

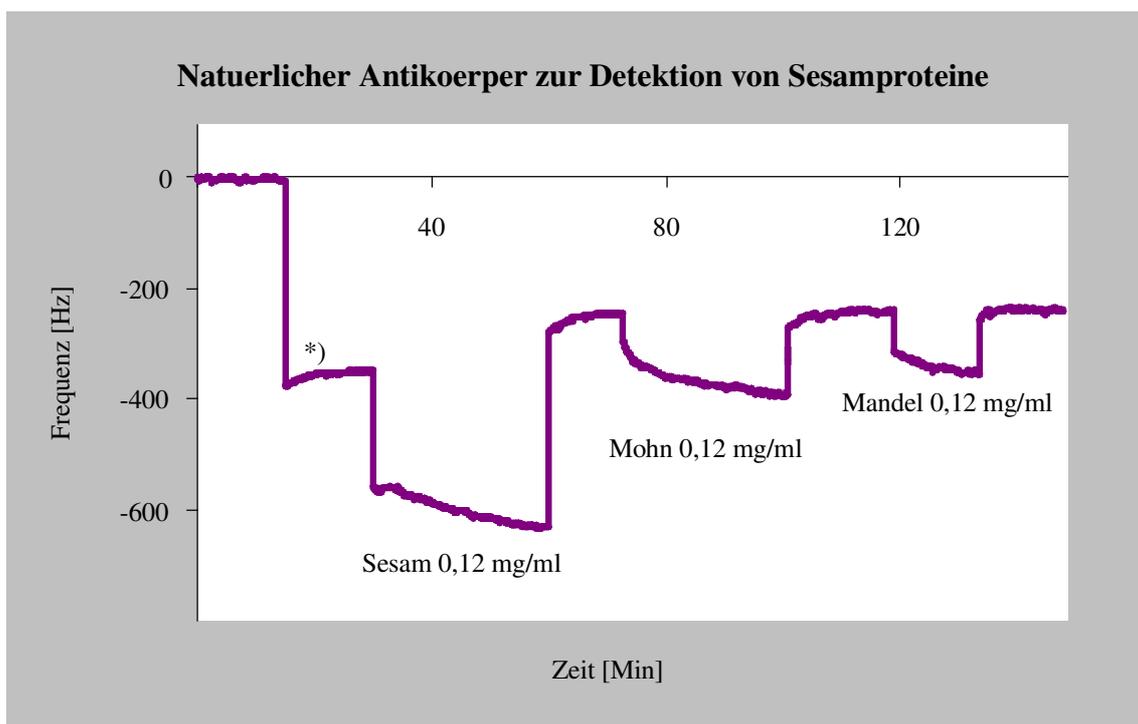


Abbildung 34: QCM-Messung mit dem natürlichen Sesamantikörper, die direkt auf Goldelektroden mobilisiert wurde*), zur Detektion von Sesamproteinen und zur Überprüfung der Querempfindlichkeit mit Mohn und Mandel.

Die Messung mit dem natürlichen Antikörper funktioniert ähnlich wie die mit dem Antikörperreplika. Es wurde zunächst Wasser injiziert um den Basisfrequenz des Quarzes zu ermitteln. Danach wurden Proteinlösung von Sesam, Mohn und Mandel nacheinander injiziert und die Frequenzänderung gemessen. Um Proteine, die an den natürlichen Antikörper auf dem Goldelektroden gebunden sind, runter zu bekommen, wurde zwei molare Guanidinhydrochloridlösung verwendet. Nach dem Entfernen der Proteinlösung aus dem Proberaum, wurde die Guanidinhydrochloridlösung injiziert. Nach ca. 40 Sekunden wurde der Quarz mit bedestilliertem Wasser gewaschen und war dann bereit für die Messung mit der nächsten Probe.

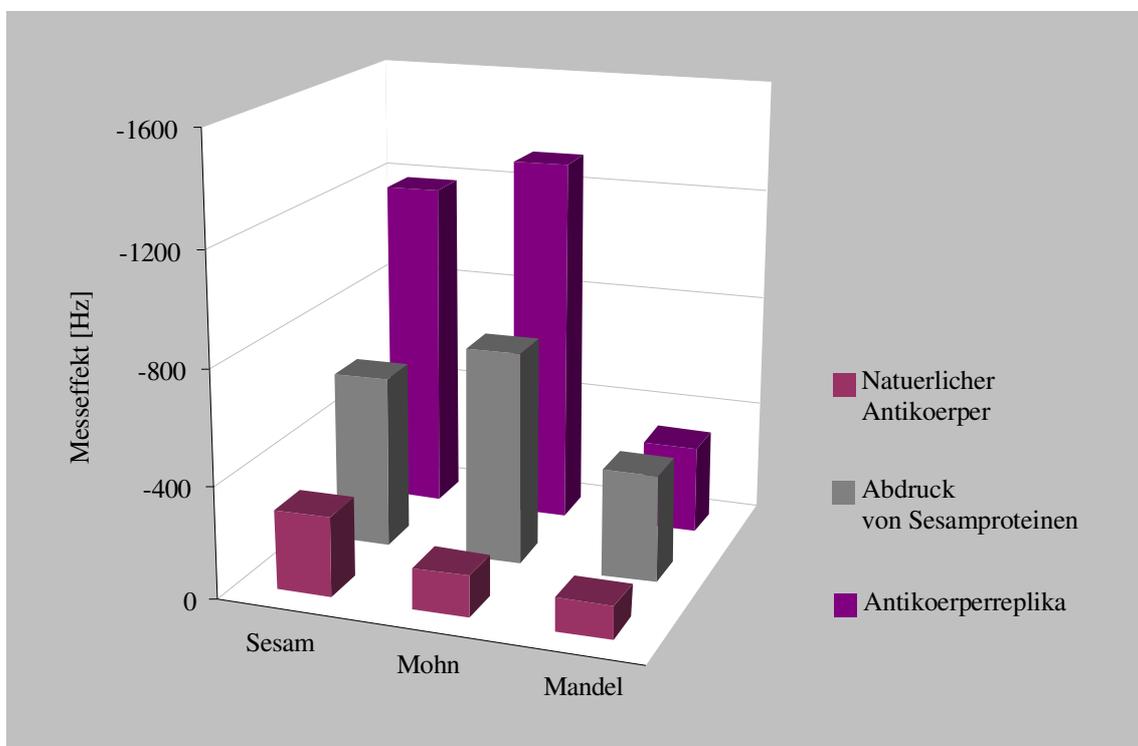


Abbildung 35: Vergleich der Messeffekt in der Querempfindlichkeit: QMB-Messung mit dem natürlichen Sesamantikörper, die direkt auf Goldelektrode mobilisiert wurde.

Die Messung mit dem natürlichen Antikörper zeigen Ergebnisse ähnlicher Profile wie die mit dem Antikörperreplika und dem Proteinabdruck. Die Frequenzänderung ist jedoch deutlich niedriger als die beiden Letzteren. Bei der Sesamproteinlösung mit der Konzentration von 0,12 mg/ml wurde ein Messeffekt von 283 Hz registriert. Er ist um die 80 % niedriger als bei der Messung mit Antikörperreplika.

Messeffekt [Hz]

	Sesam	Mohn	Mandel
Antikörperreplika	-1185	-1318	-316
Proteinabdruck	-613	-758	-383
Natürliche Antikörper	-283	-146	-114

Tabelle 4: Messeffekt der Proteinlösung aus Sesam, Mohn und Mandel in der Konzentration von 0,12 mg/ml. Vergleich der Messeffekte, die mit den unterschiedlichen sensitiven Schicht erzielt wurde: Antikörperreplika aus Polymethacrylsäure/Polyvinyl-pyrrolidon-Copolymer, Proteinabdruck in eine Schicht aus Polymethacryl-säure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer und Natürliche Antikörper auf Gold-elektroden.

Bessere Ergebnisse konnten mit der Querempfindlichkeitsmessung erzielt werden. Beide Proteinlösungen, sowohl von Mohn, als auch von Mandel, zeigen Frequenzänderungen, die wesentlich niedriger sind.

IV.3. Direkte Prägung von Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer mit Sesamprotein und Erdnussprotein

Sensitive Schicht aus Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, der mit Sesam- bzw. Erdnussproteine direkt geprägt wurde, wurde zur Bestimmung von dem jeweiligen Protein eingesetzt. Dazu wurde 5 µl Proteinextrakte auf einem 5x5 mm Glasplättchen aufgetragen und 30 Min im Kühlschrank (4 °C) stehen gelassen, damit die Proteine assemblieren können. Danach wurden überschüssige Lösung abgespinn, um zu verhindern, dass Pufferkristalle auf der Oberfläche gebildet werden. Der Polymerschicht wurde mittels Spinncoating von 5 µl Polymer auf den Goldelektroden gebracht. Die Messelektrode wurde mit Glasstempel geprägt, mit Klammer fixiert und über Nacht aushärten gelassen. Die Referenzelektrode wurde ungeprägt gelassen. Danach wurde der Stempel entfernt und der Quarz in eine Messzelle integriert. Vor der Erstmessung wurde der Quarz mehrmals mit bidestilliertem Wasser gewaschen, um Proteinreste zu entfernen.

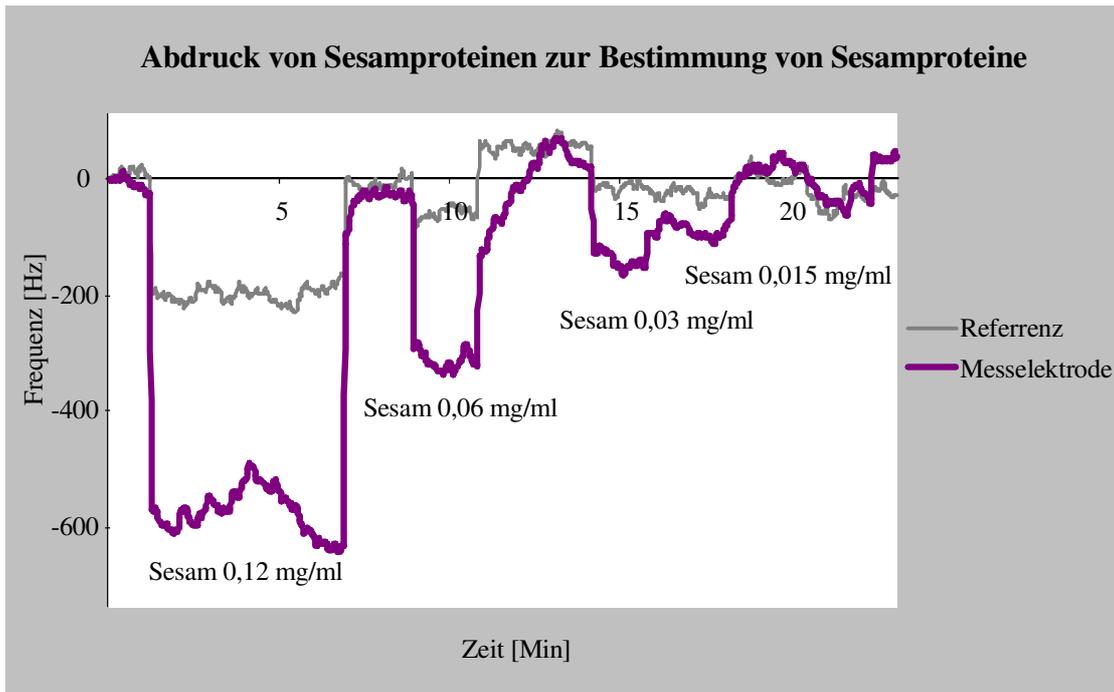


Abbildung 36: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Sesamproteinen. Zur Ermittlung der Detektionsgrenze wurden Sesamproteine in absteigenden Konzentrationen injiziert.

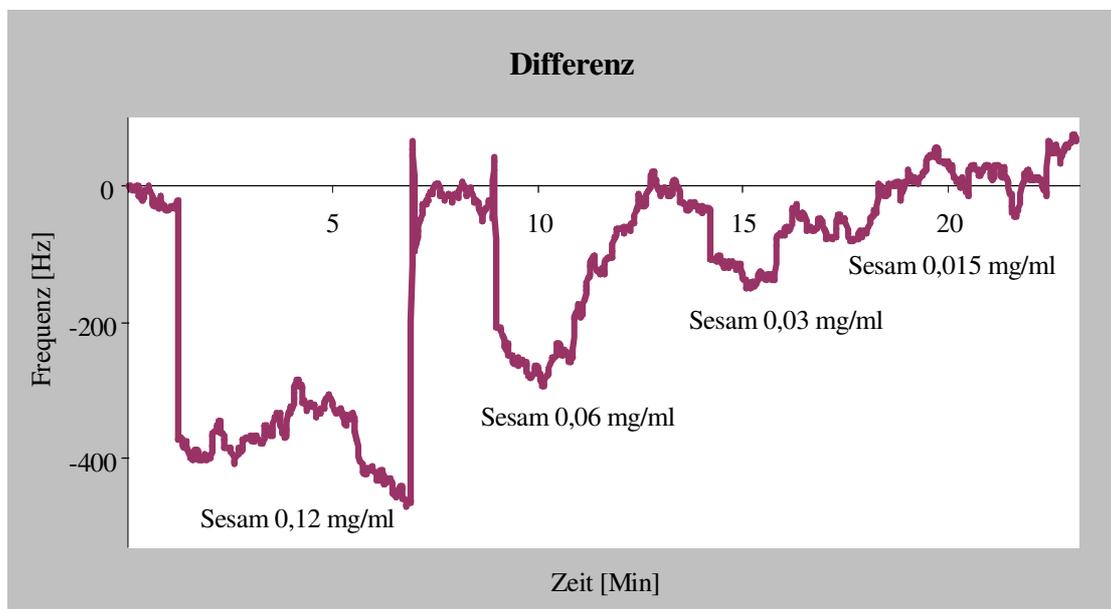


Abbildung 37: Differenzkurve der in Abbildung 36 gezeigten Messkurve

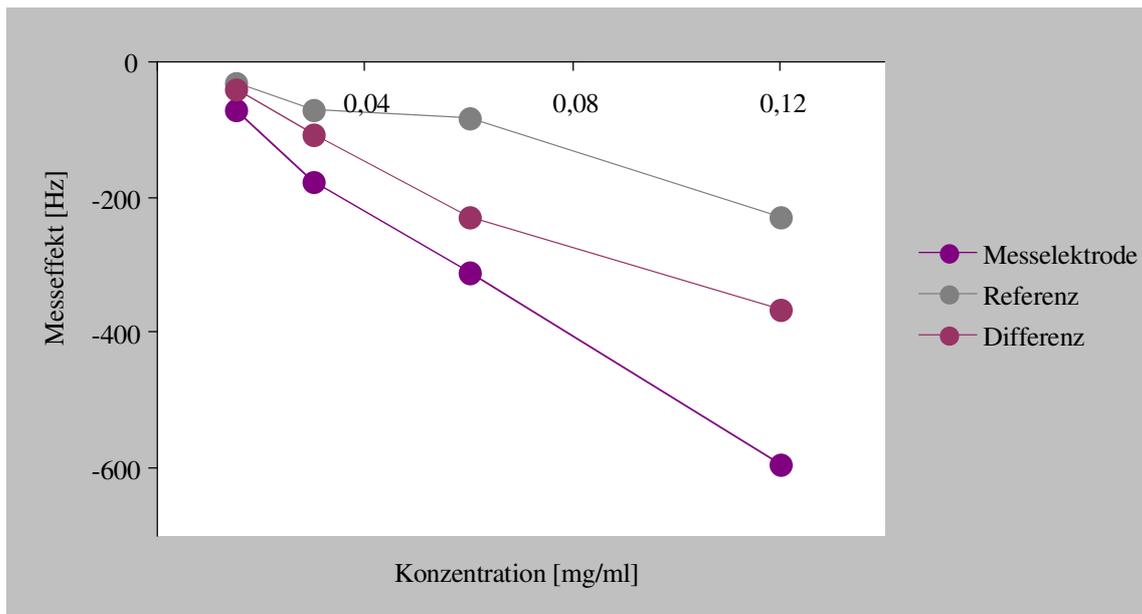


Abbildung 38: Kennlinie von der Konzentrationsabhängigkeit des Messeffektes bei der QMB-Messung mit direkte Proteinabdruck vom Sesam auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer

Sesamproteinlösung mit absteigenden Konzentrationen wurde injiziert um die Detektionsgrenze dieses sensitiven Schichtes zu bestimmen. (Abbildung 36 und Abbildung 37) Dazu wurde Sesamproteinlösung, ausgehend von der Konzentration 0,12 mg /ml schrittweise 1:1 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Der Messeffekt ist deutlich kleiner als bei den Antikörperrepliken. Für die Sesamproteinlösung mit der Konzentration von 0,12 mg/ml ist das Messsignal beim direkten Proteinabdruck ca. 600 Hz und bei den Antikörperrepliken ca. 1300 Hz. Die Detektionsgrenze liegt bei 0,03 mg/ml. Es ist deutlich schlechter als bei den Antikörperrepliken, wo die Detektionsgrenze bei 0,0019 mg/ml (Abbildung 15) liegt. Die Kennlinie des Messeffektes ist nahezu linear. (Abbildung 38)

Auch hier wurde die Selektivität durch Messungen mit verschiedenen Lebensmittelproben gleicher Konzentrationen (0,12 mg/ml) überprüft. Sie ergeben ähnliches Resultat wie bei den Antikörperrepliken. Für die hohe Kreuzempfindlichkeit spielt nachwievor eine große Rolle, dass die äußere Beschaffenheit der Proteine von den getesteten Lebensmitteln (Sesam, Erdnuss, Haselnuss und Mohn) sich sehr ähnlich ist.

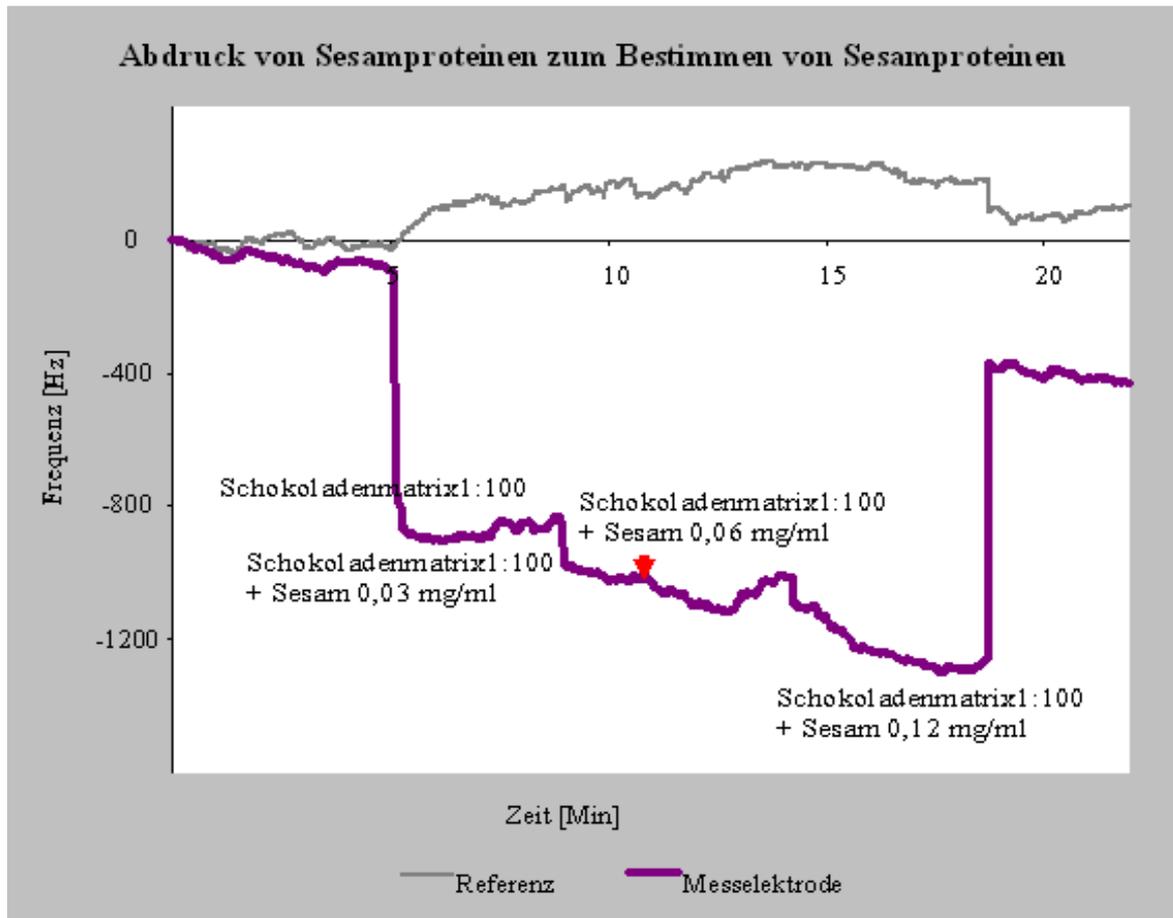


Abbildung 39: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Sesamproteinen. 1:100 verdünnte Schokoladenextrakte mit steigenden Konzentrationen von Sesamproteinen (1) 0 mg/ml, 2) 0,03 mg/ml, 3) 0,06 mg/ml, 4) 0,12 mg/ml) wurden direkt nacheinander gemessen. Zwischen den einzelnen Konzentrationen wurde keine Messung mit Wasser durchgeführt.

Die Detektion der Sesamproteine in Schokoladenmatrix (Abbildung 39 und Abbildung 40) ist etwas schwierig. Die Messung wurde mit 1:100 verdünnten Schokoladenmatrix durchgeführt. Für die Konzentrationen von 0,03 bis 0,12 mg/ml ist der Messeffekt sehr klein.

Weitere Messungen wurden mit Quarz, dessen sensitive Schicht aus Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer, die direkte Abdrucke von Erdnussproteinen tragen, durchgeführt. Gemessen wurden wässrige Lösung aus Erdnussproteinen in der Konzentrationsbereich zwischen 0,0069 und 0,55 mg/ml. (Abbildung 44 bis Abbildung 47). Für diesen Konzentrationsbereich ist Kennlinie der Messeffekt nahezu linear. (Abbildung 41) Selektivität des Sensors

wurde überprüft. Auch hier gab es hohe Kreuzempfindlichkeit bei Sesam, Haselnuss und Mohn.

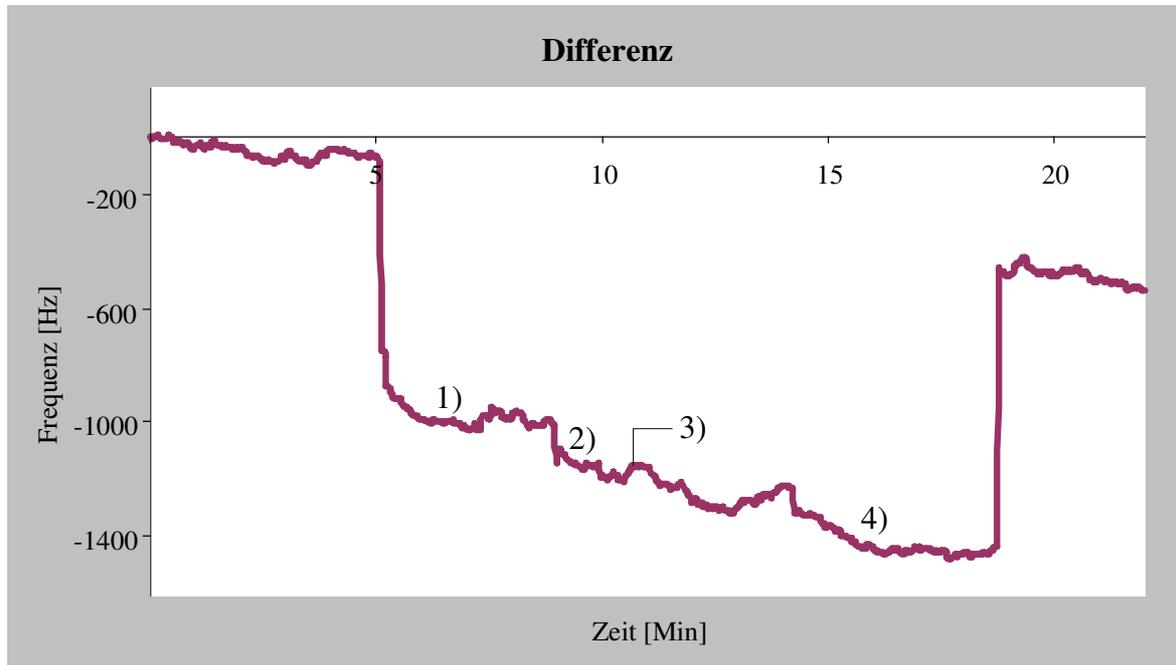


Abbildung 40: Differenzkurve der in Abbildung 39 gezeigten Messkurve: 1) Schokoladenextrakte, 1:100 verdünnt, 2) Schokoladenextrakte mit 0,03 mg/ml Sesamproteinen, 3) mit 0,06 mg/ml Sesamproteinen, 4) mit 0,12 mg/ml Sesamproteinen.

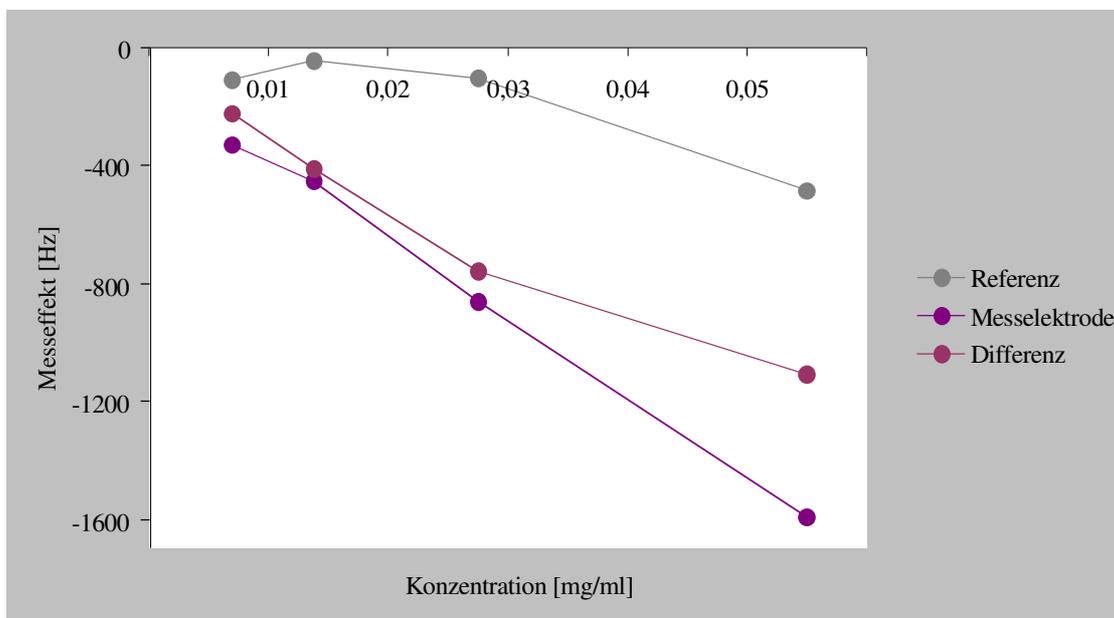


Abbildung 41: Konzentrationsabhängigkeit des Messeffektes bei der QMB-Messung mit direkte Proteinabdruck vom Erdnuss auf Polymethacrylsäure/ Polyvinylpyrrolidon-Copolymer

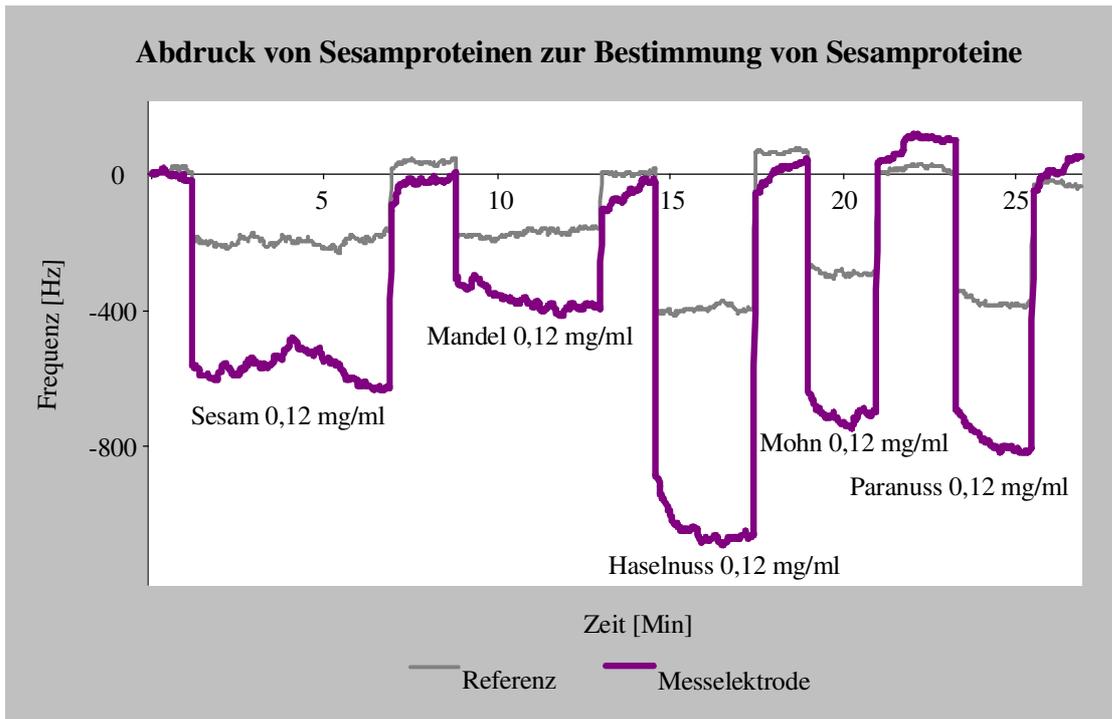


Abbildung 42: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Sesamproteinen. Zur Ermittlung der Querempfindlichkeit wurden Proteine der unterschiedlichen Lebensmittelproben mit der gleichen Konzentration nacheinander injiziert.

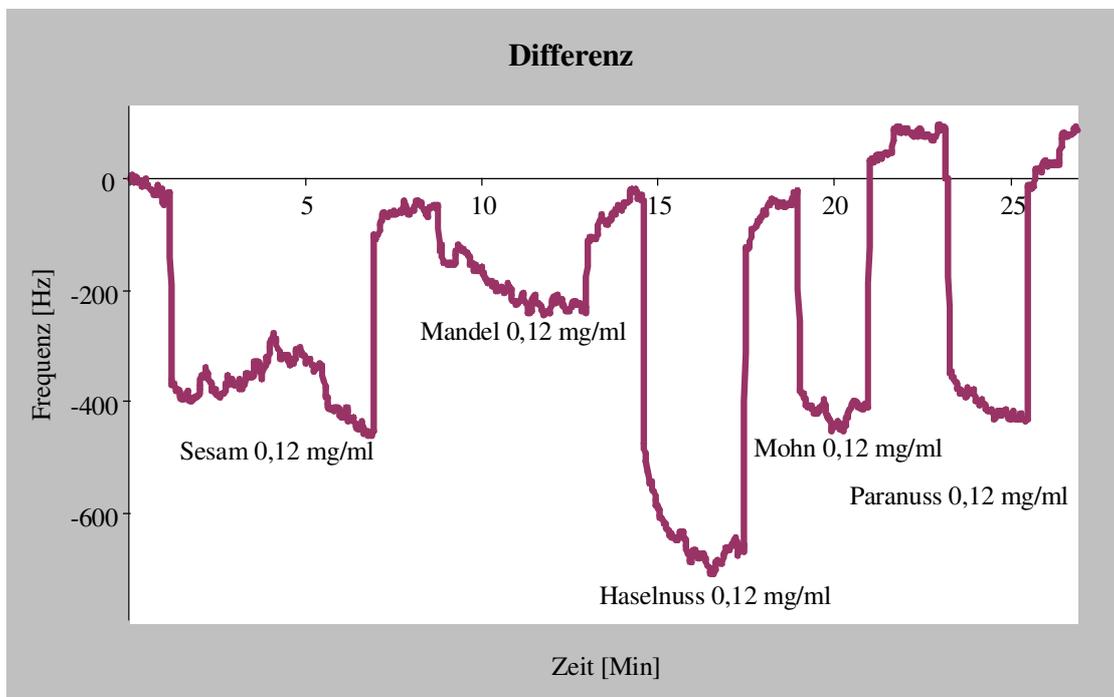


Abbildung 43: Differenzkurve der in Abbildung 42 gezeigten Messkurve

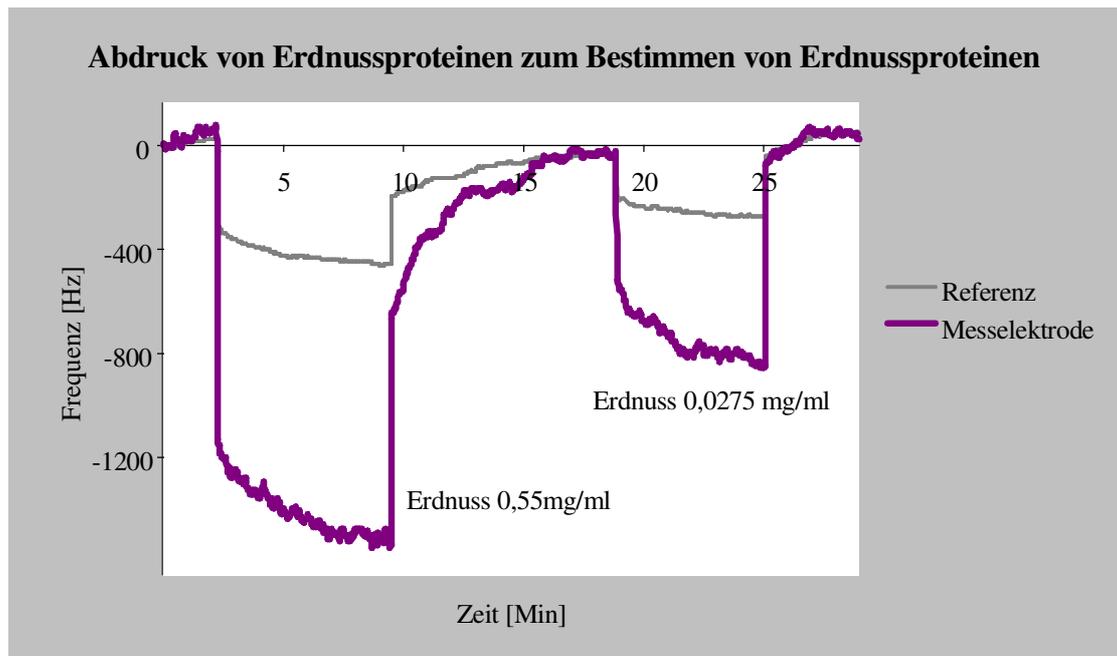


Abbildung 44: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Erdnussproteinen. Zur Ermittlung der Detektionsgrenze wurden Erdnussproteine in absteigenden Konzentrationen injiziert. Die Frequenz sinkt beim Injizieren von Proteinen, welche beim Injizieren vom Wasser wieder zurück geht.

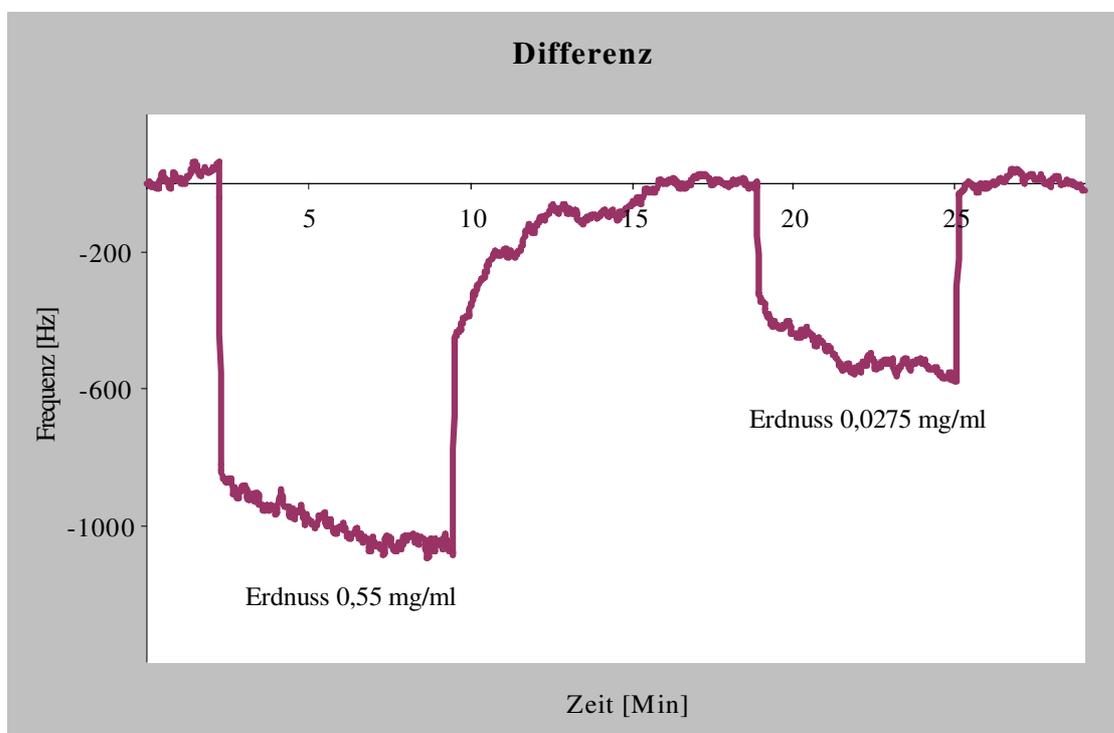


Abbildung 45: Differenzkurve der in Abbildung 44 gezeigten Messkurve

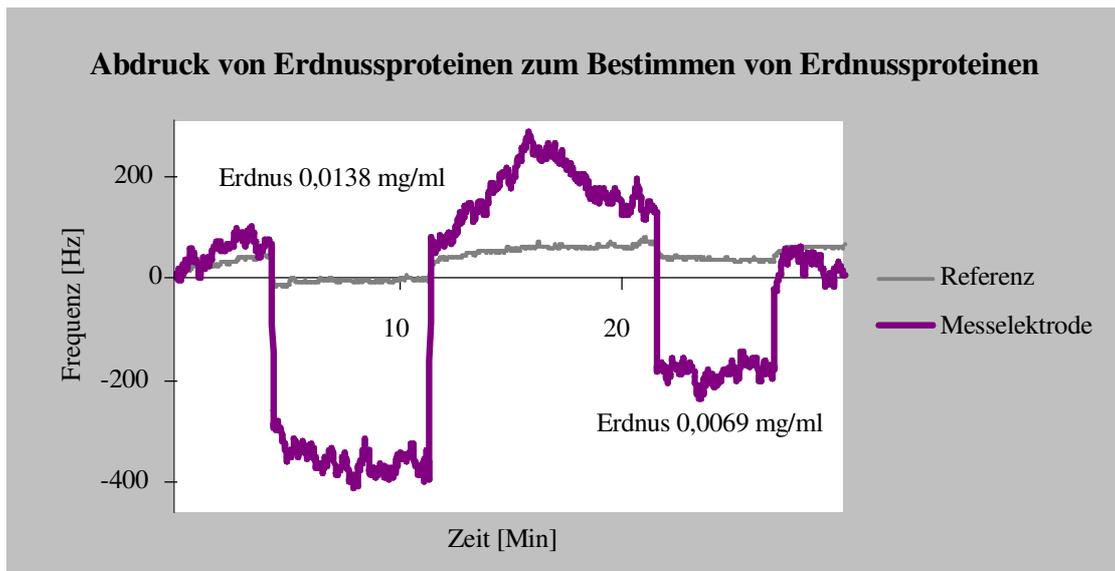


Abbildung 46: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Erdnussproteinen. Zur Ermittlung der Detektionsgrenze wurden Erdnussproteine in absteigenden Konzentrationen injiziert. Die Frequenz sinkt beim Injizieren von Proteinen, welche beim Injizieren vom Wasser wieder zurück geht.

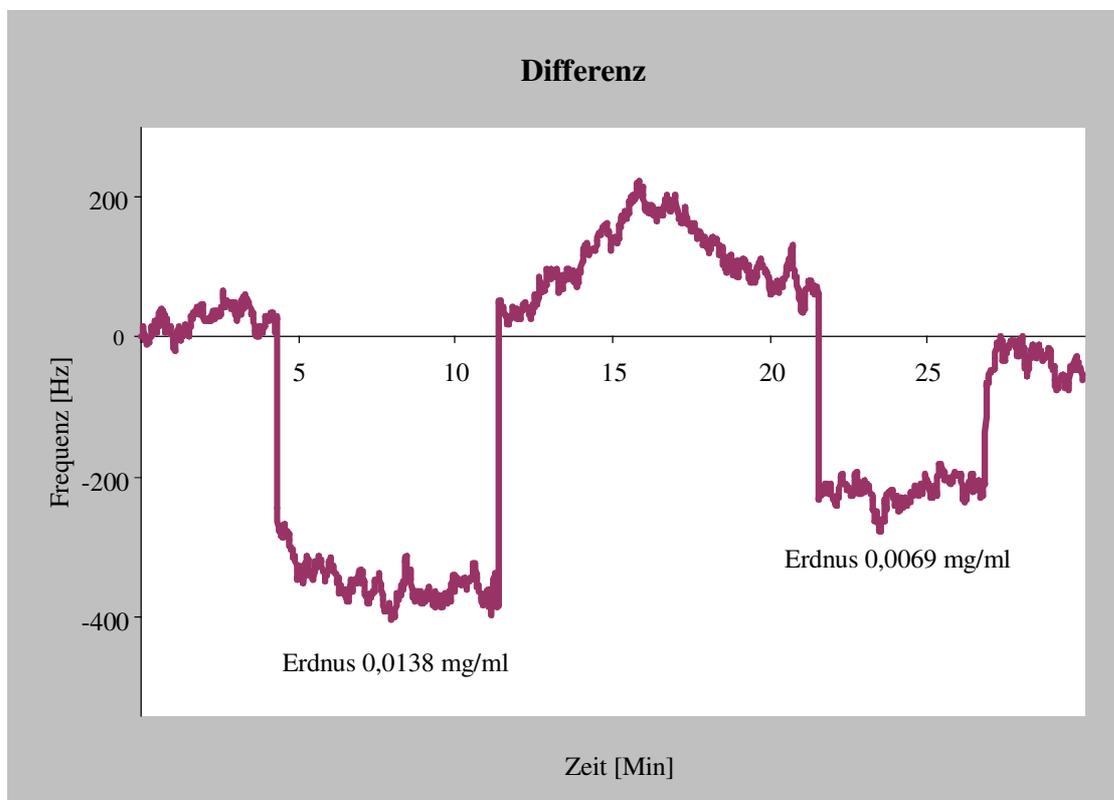


Abbildung 47: Differenzkurve der in Abbildung 46 gezeigten Messkurve

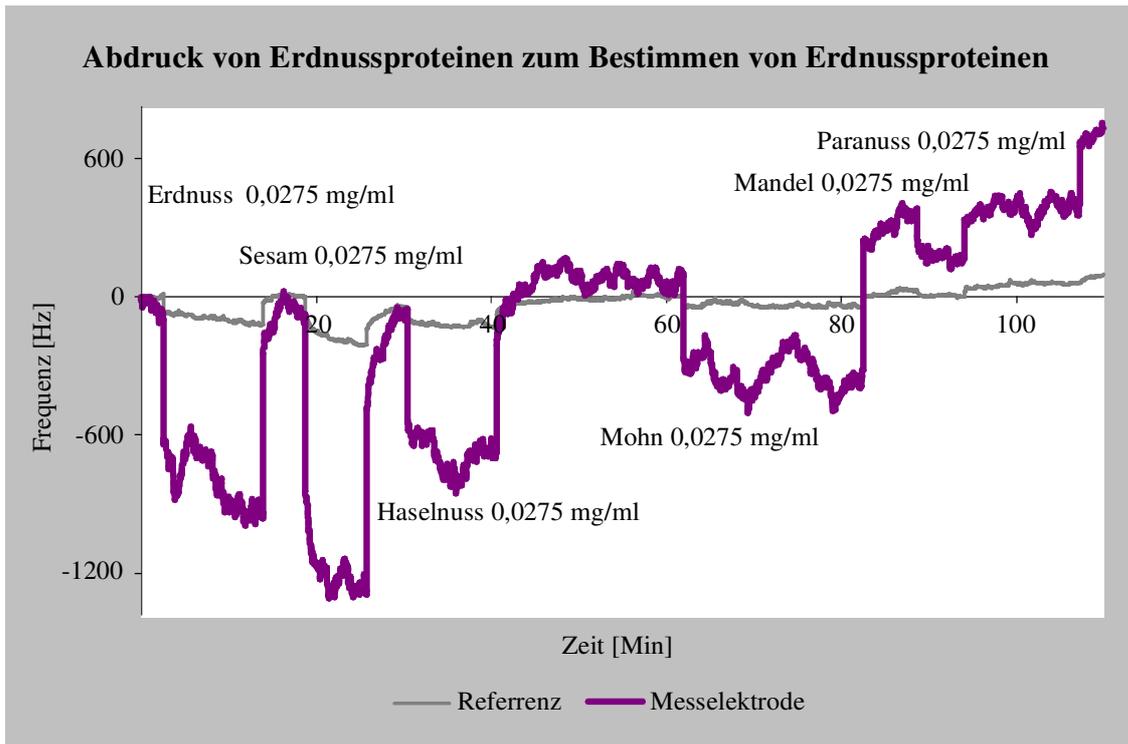


Abbildung 48: QMB-Messung auf Polymethacrylsäure/Polyvinylpyrrolidon-Copolymer. Messelektrode geprägt mit Erdnussproteinen. Zur Ermittlung der Querempfindlichkeit wurden Proteine der unterschiedlichen Lebensmittelproben mit der gleichen Konzentration nacheinander injiziert.

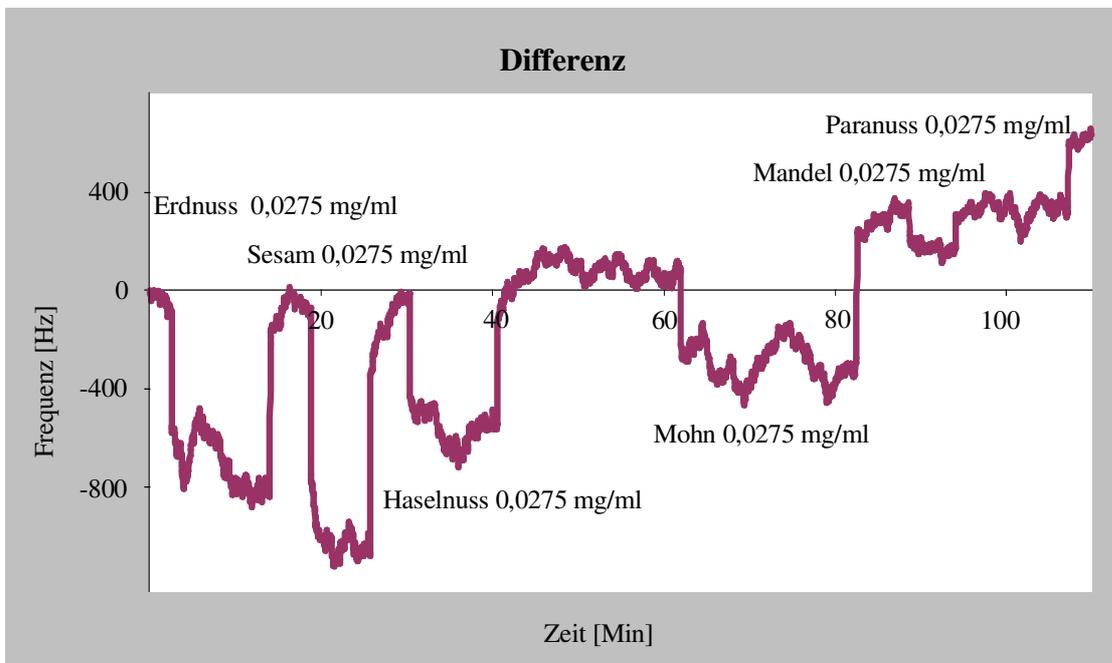


Abbildung 49: Differenzkurve der in Abbildung 48 gezeigten Messkurve

V. Zusammenfassung & Summary

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, sensitive Schichten für QCM-Sensoren zur Detektion von Lebensmittelproteinen herzustellen. Im speziellen sollten Sensoren für allergene Sesamproteine generiert werden. Dabei sollte die sensitive Schicht selektiv die Sesamproteine binden, und diese auch in komplizierter Matrices erkennen. Wichtig ist es auch, dass die Sesamproteine bei niedrigen Konzentrationsbereichen detektiert werden konnten.

Für die sensitive Schicht wurde ein Copolymer aus Polymethacrylsäure und Polyvinylpyrrolidon hergestellt. Es wurden Sesamproteine in die Schicht aus einem Vorcopolymer gedrückt, um eine selektive Strukturierung durchgeführt. Die Detektionsgrenzen lagen bei 0,015 mg/ml Sesamprotein und bisweilen noch tiefer.

Besonders gute Ergebnisse wurden mit der Methode der künstlichen Antikörper erzielt. Auch hier wurde das gleiche Copolymer aus Polymethacrylsäure und Polyvinylpyrrolidon verwendet. Statt des direkten Abdrucks von den Sesamproteinen wurden positive Abdrücke der Antikörper, die Sesamproteine selektiv binden, in dem Copolymer erzeugt. Mit dieser Methode konnte eine Detektionsgrenze von 0,0019 mg/ml erreicht werden. Im Vergleich zu der sensitiven Schicht aus direktem Proteinabdruck wurden auch bei der Detektion von Sesamproteinen in Matrixlösung (aus Schokoladenproteine) besonders große Messeffekte erzielt.

Die Güte der Antigen-Antikörper-Bindungseffekt zwischen Sesamantikörper und Sesamproteine wurde mittels QCM Messung mit dem natürlichen Antikörper überprüft. Der Messeffekt ist meist im Falle des positiven Abdrucks, der Herstellung eines Replicas, am größten.

Goal of the work presented is to develop sensitive layers of QCM sensors for detecting proteins of the leguminous plants, especially sesame protein. The sensitive layer should bind the sesame protein selectively, and it should recognize these analytes also in complex matrices. It is also important to be able detecting sesame protein, if their concentration is very low.

A copolymer of acrylic acid and polyvinyl pyrrolidone was synthesized. The sesame protein was pressed into the copolymer layer to generate a selection surface patterning. The detection limit was 0.015 mg/ml and lower of sesame protein in solution.

Improved results were obtained with antibody replica. The same copolymer of acrylic acid and polyvinyl pyrrolidone was used. Instead of direct imprinting with sesame protein, antibody replica, which are generated by double imprinting, would be used.²⁷ It binds sesame protein selectively. With this method, a detection limit of 0.0019 mg/ml was achieved. Comparing with direct printing of sesame protein, measurements of sesame protein by replica in the complex matrix of chocolate showed the best results.

Measurement with natural antibody revealed the binding strength between sesame protein and natural antibody. The most pronounced sensor responses, comparing all strategies described, were obtained by applying replica as sensor coatings.

VII. Literatur

- ¹ F.L. Dickert, P. Lieberzeit, S. Gazda-Miarecka, K. Halikias, K.-J. Mann, **Modifying Polymers by Selforganisation for the Mass-Sensitive Detection of Environmental and Biogenous Analytes**, Sensors and Actuators B 100, 112 (2004).
- ² Peter A. Lieberzeit, A. Afzal, A. Rehman, Franz L. Dickert; **Nanoparticles for detecting pollutants and degradation processes with mass-sensitive sensors**; Sensors and Actuators B 127, 2007
- ³ Peter A. Lieberzeit, Sylwia Gazda-Miarecka, Konstantinos Halikias, Christian Schirk, Jörg Kauling, Franz L. Dickert; **Imprinting as a versatile platform for sensitive materials – nanopatterning of the polymer bulk and surfaces**; Sensors and Actuators B 111-112, 2005
- ⁴ Franz L. Dickert, Peter Lieberzeit, Oliver Hayden; **Sensor strategies for microorganism detection – from physical principles to imprinting procedures**; Analytical and Bioanalytical Chemistry 377, 2003
- ⁵ Zhao Li, Jianfu Ding, Michael Day, Ye Tao, **Molecularly imprinted Polymeric Nanospheres by Diblock Copolymer Self-Assembly**, Macromolecules 39, 2006
- ⁶ Peter A. Lieberzeit, Adeel Afzal, Gerd Glanzing, Franz L. Dickert; **Molecularly imprinted sol-gel nanoparticles for mass-sensitive engine oil degradation sensing**; Analytical and Bioanalytical Chemistry 389, 2007
- ⁷ Gianluca Ciaradelli, Cristina Borrelli, Davide Silvestri, Caterian Cristallini, Nicoletta Barbani, Paolo Giusti, **Supported imprinted nanospheres for the selective recognition of cholesterol**, Biosensors and Bioelectronics 21, 2006
- ⁸ O. Hayden, D. Podlipna, X. Chen, S. Krassnig, A. Leidl, F. L. Dickert, **Nanolithography and subnano molecular interactions for biomimetic sensors**, Materials Science and Engineering C **26**, 924 (2006).
- ⁹ F.L. Dickert, **Sensoren für Gase und Lösungsmitteldämpfe – Ein Beitrag zur Umweltanalytik**, Chemie unserer Zeit 3 1992

-
- ¹⁰ G. Fischerauer, F.L. Dickert, **An Analytic Model of the Dynamic Response of Mass-Sensitive Chemical Sensors**, Sens. Actuators B 123, 993 (2007).
- ¹¹ F.Oehme, **Chemische Sensoren von heute und morgen. 1. Auflage** Expert Verlag Renningen-Mannheim, 1994
- ¹² G. Sauerbrey, **Mitteilung aus dem 1. Physikalischen Institut der TU Berlin A.E.U. 18** 1964
- ¹³ F.L. Dickert, O. Schuster, **Piezoelektrische Chemosensoren - von der Adsorption zur molekularen Erkennung mit Host-Guest Chemie**, Chemie in unserer Zeit 28, 147 (1994).
- ¹⁴ F.L. Dickert, K. Halikias, **Sensors based on fingerprints of neutral and ionic analytes in polymeric materials**, Sensors and Actuators 1-4, 2001
- ¹⁵ M. Jenik, A. Seifner, S. Krassnig, K. Seidler, P. A. Lieberzeit, F. L. Dickert, C. Jungbauer, **Sensors for Bioanalytes by Imprinting - Polymers Mimicking both Biological Receptors and the Corresponding Bioparticles**, Biosensors and Bioelectronics 25, 9 (2009).
- ¹⁶ V. Prakash, P.K. Nandi, J. Agric. Food Chem. 26, 1978
- ¹⁷ L. A. Johnson, T. M. Suleiman, E. W. Lusas, **Sesame Proteine: A Review and Prospectus**, J. AM. Oil Chemists Soc. Vol. 56, 1979
- ¹⁸ http://www.uni-graz.at/~katzner/germ/Sesa_ind.html
- ¹⁹ K. Bezer, L. Bardina, G. Grishina, H. A. Sampson, **Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage as common food allergens**, Journal of Allergy and Clinical Immunology 110, 2002
- ²⁰ F.L. Dickert, P. Lieberzeit, S. Gazda Miarecka, K.-J. Mann, O. Hayden, C. Palfinger, **Synthetic receptors for chemical sensors - subnano- and micrometre patterning by imprinting techniques**, Biosensors and Bioelectronics 20, 1040 (2004).

-
- ²¹ O. Hayden, P. A. Lieberzeit, D. Blaas, F.L. Dickert, **Artificial Antibodies for Bioanalyte Detection - Sensing Viruses and Proteins**, Adv. Funct. Mater. 16, 1269 (2006).
- ²² P.A. Lieberzeit, A. Afzal, D. Podlipna, S. Krassnig, H. Blumenstock, F.L. Dickert, **Printing Materials in Micro - and Nano-Scale - Systems for Process Control**, Sens. Actuators B 126, 153 (2007).
- ²³ F.L. Dickert, M. Tortschanoff, W.E. Bulst, G. Fischerauer; **Molecularly Imprinted Sensor Layers for the Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water**; Analytical Chemistry 71, 1999
- ²⁴ P.A. Lieberzeit, C. Schirk, G. Glanznig, S. Gazda-Miareck, R. Bindeus, H. Nannen, Jörg Kauling, F.L. Dickert, **From Nanopatterning to Functionality - Surface- and Bulkimprinting for Analytical Purposes**, Superlattices and Microstructures 36, 133 (2004).
- ²⁵ M. Jenik, R. Schirhagl, C. Schirk, O. Hayden, P. Lieberzeit, D. Blaas, G. Paul, F. L. Dickert, **Sensing Picornaviruses Using Molecular Imprinting Techniques on a Quartz Crystal Microbalance**, Analytical Chemistry 81, 5320-5326 (2009).
- ²⁶ F. L. Dickert, P.A. Lieberzeit, P. Achatz, C. Palfinger, M. Fassnauer, E. Schmid, W. Werther, G. Horner, **QCM array for on-line-monitoring of composting procedures**, Analyst 129, 432 (2004).
- ²⁷ O. Hayden, C. Haderspöck, S. Krassnig, X. Chen and F.L. Dickert, **Surface Imprinting Strategies for the Detection of Trypsin**, Analyst, 133, 1044 (2006).