

Versuchsziel:

Durchgeführt wird ein Immunoassay, die Reflektometrische Interferenz Spektroskope (RIfS), am Beispiel von Testosteron als Analyt. Hierbei können die Bindungsereignisse mittels der Verschiebung des schicht-spezifischen Interferenzspektrums verfolgt werden.

Lehrinhalt:

Immunoassays sind immunanalytische Testverfahren für die Erkennung oder den Nachweis eines Analyten (Antigens) durch Bindung des Antigens an einen Antikörper. Ausgelöst durch die physikalischen Vorgänge dieser Bindung kann eine Messung erfolgen. Einsatzgebiete für Immunoassays sind dann, wenn der Analyt nicht durch spezifische Eigenschaften detektiert werden kann, mehrere Analyten parallel betrachtet werden und bei geringer Nachweisgrenze bei zu komplexen Umgebungsbedingungen. Immunoassays können unterteilt werden in Tests, die Markierungsmoleküle verwenden und solche, die keine Markierungsmoleküle verwenden. Die im Versuch durchgeführte Reflektometrische Interferenz Spektroskopie fällt in die zweite Kategorie.

Folgende drei beispielhafte Testformate werden betrachtet:

1. Sandwich-Assay:

Zunächst wird die Oberfläche des Sensors mit einem Fängerantikörpers präpariert, der bei Kontakt mit dem Analyten bindet. Anschließend wird ein weiterer (meist markierter) Antikörper - der Detektionsantikörper - hinzugegeben, der dann vom Messgerät erfasst wird. Vorteile dieses Formats sind eine hohe Sensitivität und Spezifität. Nachteile sind hingegen, dass der Analyt zwei unterschiedliche Bindungsstellen haben muss, wodurch nur große Stoffe in Frage kommen. Angewandt wird der Sandwich-Array z.B. in Form des ELISA-Tests

2. Bindungshemmungstest (im Versuch durchgeführt)

Hier wird die Probe zunächst mit einer bestimmten Konzentration an Antikörpern angereichert. Liegt nun eine hohe Konzentration an Analyten in der Probe vor, binden viele Antikörper und nur wenige ungebundene Antikörper bleiben übrig. Um diese übrigen zu bestimmen wird Mischung auf den Sensor gegeben, an dem zuvor schon der Analyt selber gebunden wurde. Ein geringes Signal lässt somit auf eine hohe Analytenkonzentration in der Probe schließen. Anwendung findet dieses Format, wenn der Analyt im Gegensatz zum Sandwich-Assay nur eine Bindung eingehen kann.

3. Direktes Testformat

Wie der Name schon sagt wird hier der Analyt direkt zum auf dem Sensor gebundenen Antikörper gegeben und das entsprechende Signal bestimmt. Dieses Signal kann beispielsweise durch einen veränderten Brechungsindex gemessen werden. Allerdings ist das Verfahren nur bei markierungsfreien Methoden anwendbar und hat eine geringe Sensitivität.

Wie bereits erwähnt ist das im Versuch verwendete Verfahren die Reflektometrische Interferenzspektroskopie. Sie beruht auf einer Mehrfachreflexion von Weißlicht an dünnen Schichten. Bei jedem Auftreffen des Lichts auf eine Schicht wird ein Teil reflektiert und es entsteht eine Phasendifferenz $\Delta\phi$ zwischen auftreffenden und reflektierten Licht. Durch diese Differenz kommt es zur Interferenz der reflektierten Strahlen und es entsteht ein Interferenzspektrum.

Gemessen wird die Änderung der Intensität R vor und nach der Bindung der Analyten durch Änderung der optischen Schichtdicke ($n \cdot d$). In der klassischen RfS wird außerdem auch Veränderung eines Extrempunktes betrachtet.

$$R = R_1 + R_2 + 2\sqrt{R_1 R_2} \cos(4\pi n d / \lambda) \quad (\text{mit: Wellenlänge } \lambda)$$

Weiterentwickelt wurde dieses Prinzip in Form der 1- λ Reflektometrie. Durch Verwendung von Licht einer Wellenlänge und einer Photodiode wird hier nur die Intensitätsänderung betrachtet. Je nach Trägersystem wird eine geeignete Wellenlänge gewählt.

Die Bildung des Analyt-Antikörper-Komplexes lässt sich beschreiben über das Massenwirkungsgesetz oder aus der freien Bindungsenthalpie. Hierbei geben beispielsweise die Gleichgewichtskonstanten Aufschluss über die thermodynamischen Eigenschaften des Komplexes. Die Diffusionsgeschwindigkeit der Analytmoleküle zur Rezeptoroberfläche ergibt sich aus den Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten (k_{Ass} bzw. k_{Diss}) und dem Massenwirkungsgesetz durch

$$K = \frac{k_{\text{Ass}}}{k_{\text{Diss}}} = \frac{c_{\text{Ag-Ak}}}{c_{\text{Ag}} \cdot c_{\text{Ak}}}$$

$$\frac{dc_{\text{Ag-Ak}}}{dt} = k_a \cdot c_{\text{Ag}} \cdot c_{\text{Ak}} - k_d \cdot c_{\text{Ag-Ak}}$$

mit:

$c_{\text{Ag-Ak}}$	Konzentration Analyt-Antikörper-Komplex	c_{Ag}	Gleichgewichtskonzentration Antigen
t	Zeit	c_{Ak}	Gleichgewichtskonzentration Antikörper
k_a	Assoziationsratenkoeffizient	k_d	Dissoziationsratenkoeffizient

Auffällig ist, dass die Diffusionsgeschwindigkeit hierbei die Bindungskinetik beeinflusst und die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten selbst in die Wechselwirkungskinetik mit eingehen.

Eine kinetische kontrollierte Reaktion liegt dann vor, wenn die Sensoroberfläche nicht nur durch Diffusion limitiert ist, d.h. eine im Vergleich zur Rezeptorbeladung hohe Analytkonzentration vorliegt. Hier ergibt sich eine Bindungsrate von

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a \cdot c \cdot (\Gamma_{\text{max}} - \Gamma(t)) - k_d \Gamma(t)$$

mit:

$\Gamma(t)$	Beladung nach Zeit	c	Gesamtkonzentration
$\Gamma(t)$	maximale Beladung		

Bei konstanter Bindungsrate spricht man von Kinetik pseudo-erster Ordnung.

Umgekehrt bezeichnet man die Reaktion bei hoher Rezeptorkonzentration zu niedriger Analytkonzentration als Diffusionslimitierte Reaktion. Hier lautet die Bindungsrate

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a(\Gamma_{max} - \Gamma(t)) \frac{k_D c_V + k_d \Gamma(t)}{k_a(\Gamma_{max} - \Gamma(t)) + k_D} - k_d \Gamma(t)$$

Bei einer hohen Maximalbeladung Γ_{max} hängt die Bindungsrate nur von Transport an die Oberfläche ab. Man spricht von der Massentransport-kontrollierten Bindung. Bei Durchführung mehrerer dieser Bindungen mit unterschiedlichen Analyt-Konzentrationen erhält man eine lineare Bindungskurve. Aus dem Auftragen derer Steigung gegen die logarithmische Konzentration kann eine Titrationskurve erhalten werden. Hieraus kann wiederum die Affinitätskonstante ermitteln. Dieses Verfahren nennt man Affinitätstitration.

Vorfragen:

Aufgabe 1) *Ein wichtiger Botenstoff bei Entzündungen ist das Interleukin-6. Daher kann dieser Parameter als Entzündungsmarker für die Diagnostik eingesetzt werden. Es soll nun ein neuer, markierungsfreier Immunoassays für IL-6 entwickelt werden. Welche(s) Assay-Format(e) könnte(n) dafür verwendet werden? Bitte begründen!*

1. Sandwich-Assay

Vorteil: Interleukin-6 besteht aus 148 Aminosäuren und ist somit groß Außerdem hat es genügend Bindungsstellen für Antikörper.

Nachteil: Vor Durchführung können Antikörper markiert werden, was den Test sehr kostspielig machen kann. Außerdem steigen die Kosten durch die Verwendung von zwei Antikörpern

2. Direktes Testformat

(generell nur bei markierungsfreier Methode einsetzbar)

Vorteil: kostengünstig und einfach, da nur ein Antikörper nötig ist

Nachteil: geringe Sensitivität

3. Bindungshemmttest

eignet sich für auch kleine Analytmoleküle mit nur einer Bindungsstelle

aber daher nicht geeignet für dieses Protein

Folgerung: Je nach finanzieller Möglichkeiten sind die Formate 1 und 2 zu empfehlen

Aufgabe 2) *Welche alternative Methode mit Markierungsmolekülen gibt es noch zur Analyse biomolekularer Wechselwirkungen (benenne 3)? Welche Größe wird bei diesen Methoden jeweils gemessen?*

1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Basiert auf dem Prinzip des Sandwich-Assay, d.h. auf einer enzymatischen Farbreaktion und der Interaktion von Antigen und Antikörper. Hier wird das Signal durch Anbindung des Detektionsantikörpers an das Antigen gemessen.

2. Fluoreszenzimmunoassay (FIA)

An den Antikörper werden Fluoreszenzfarbstoffe gebunden, die diesen somit sichtbar machen.

3. Radioimmunoassay (RIA)

Gemessen wird die Konzentration eines radioaktiv markierten Antigens in Verbindung mit einem Antikörper. Dadurch können auch geringe Konzentration beispielsweise von Pharmaka, Enzymen und gemessen werden.

Aufgabe 3) Wie würde eine Kalibrierfunktion für einen Assay mit direktem Testformat aussehen? Bitte graphisch und in Worten skizzieren!

Aufgetragen wird das relative Signal über die Antikörper-Konzentration. Es ergibt sich eine sigmoidale Sättigungsfunktion. Anfangs ist das Signal wegen der niedrigen Antikörper-Konzentration schwach und steigt mit steigender Konzentration an. Ist das Signal maximal sind alle Antikörper mit Antigenen abgesättigt sind. Dieses Signal steigt somit auch bei Zugabe weiterer Analyten nicht.

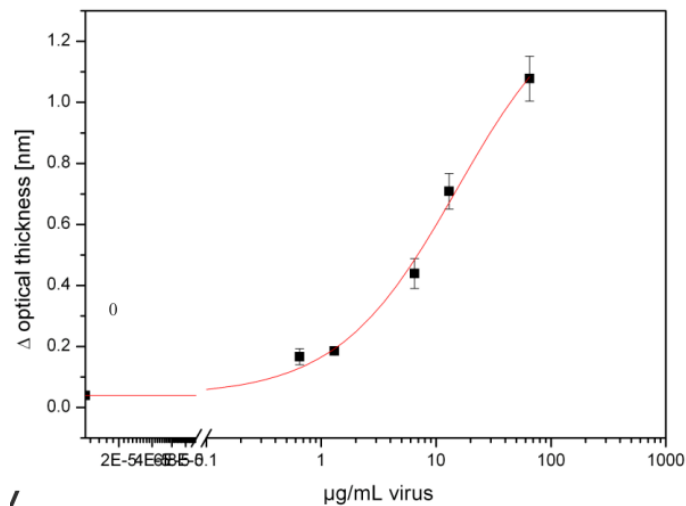


Abbildung 1: Kalibrierfunktion am Beispiel eines direkten Tests

Aufgabe 4) Welche Faktoren beeinflussen die Gleichgewichtskonstante (Thermodynamik bzw. Massenwirkungsgesetz)

Über das Massenwirkungsgesetz wird die Gleichgewichtskonstante bestimmt durch Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten und der Konzentration von Antigen, Antikörper und Antigen-Antikörper-Komplex („AgAk-Komplex“)

$$K = \frac{c_{\text{AgAk-Komplex}}}{c_{\text{Antigen}} * c_{\text{Antikörper}}} = \frac{k_{\text{Assoziation}}}{k_{\text{Dissoziation}}}$$

Über die freie Bindungsenthalpie wird sie beeinflusst durch Temperatur und Druck.

$$\Delta G^0 = -RT * \ln(K)$$

Aufgabe 5) Ihr habt eine Testosteron-Stammlösung von 100ng/mL und euer Probevolumen für eine Messung beträgt 1mL. Wieviel μL Testosteron-Stammlösung müsst ihr verwenden, damit eure Probe eine Konzentration von 0,3 ng/mL Testosteron enthält?

$$\text{Aus } c_{\text{Stammlösung}} * V_{\text{Stammlösung}} = c_{\text{Probe}} * V_{\text{Probe}} \text{ folgt } V_{\text{Stammlösung}} = \frac{c_{\text{Probe}} * V_{\text{Probe}}}{c_{\text{Stammlösung}}}$$

mit $c_{\text{Stammlösung}} = \frac{100\text{ng}}{\text{mL}}$; $c_{\text{Probe}} = \frac{0,3\text{ng}}{\text{mL}}$; $V_{\text{Probe}} = 1\text{mL}$ ergibt sich:

$$V_{\text{Stammlösung}} = 3 * 10^{-3}\text{mL} = 3\mu\text{L}$$

Versuchsverlauf und Auswertung:

Folgende Messungen wurden durchgeführt:

Messung	c_{Soll} (Testosteron)	$V_{\text{Testosteron}}$	$V_{\text{Antikörperlösung}}$	$V_{\text{PBS-Puffer}}$
1	0 ng/mL	0 μL	100 μL	900 μL
2	3 ng/mL	30 μL ($c: 100 \frac{\text{ng}}{\text{mL}}$)	100 μL	870 μL
3	100 ng/mL	10 μL ($c: 1000 \frac{\text{ng}}{\text{mL}}$)	100 μL	890 μL
4	analog zu Messung 1			

Der verwendete SAS-Reader führt alle 5 Sekunden einen Messpunkt. Für alle durchgeführten Messungen gilt folgender Zeitablauf:

Zeit [s]	Messpunkt	Vorgang	Verwendete Lösung
0 – 75	0 – 15	Baseline	PBS-Puffer, pH=7,4
ca. 75 – 750	16 – 150	Probeninjektion	Probe
ca. 750 – 900	151 – 180	Baseline	PBS-Puffer
ca. 900 – 1100	181 – 220	Regeneration	GdnHCl (Guanidiniumhydrochlorid)
ca. 1100 – 1250	221 - 250	Baseline	PBS-Puffer

Nach Aufzeichnung des 250ten Messpunktes wurde die Messung weitergeführt, bis in etwa der Wert der anfänglichen Baseline erreicht wurde.

Frage 1) Stellen Sie Ihre Messungen graphisch dar und generieren Sie hierfür die passende Zeitachse (1 Messpunkt entspricht 5 Sekunden). Setzen Sie den y-Wert bei $t=250\text{ s}$ auf 100 %. Beschreiben Sie Ihre Beobachtungen aus den durchgeführten Messungen. Diskutieren Sie den Verlauf der Kurven während der Probeninjektion und diskutieren Sie die Reproduzierbarkeit Ihrer Messungen.

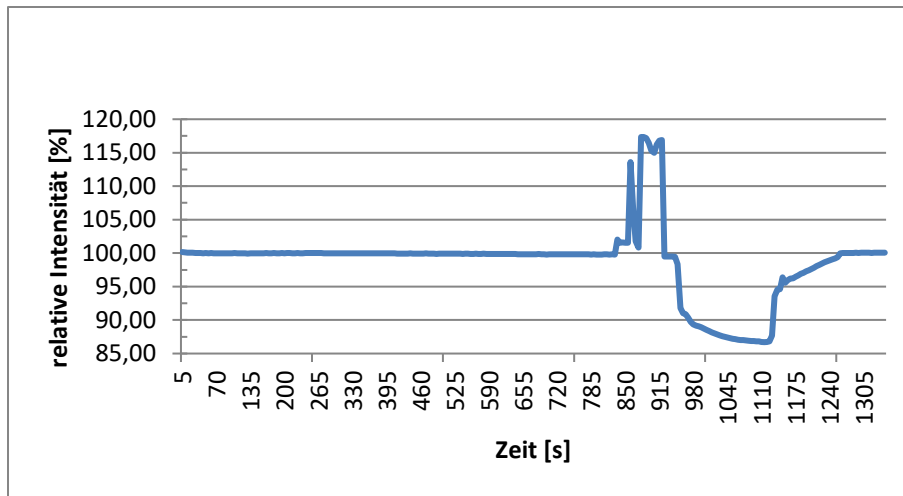


Diagramm 1: Messdaten zu Messung 1

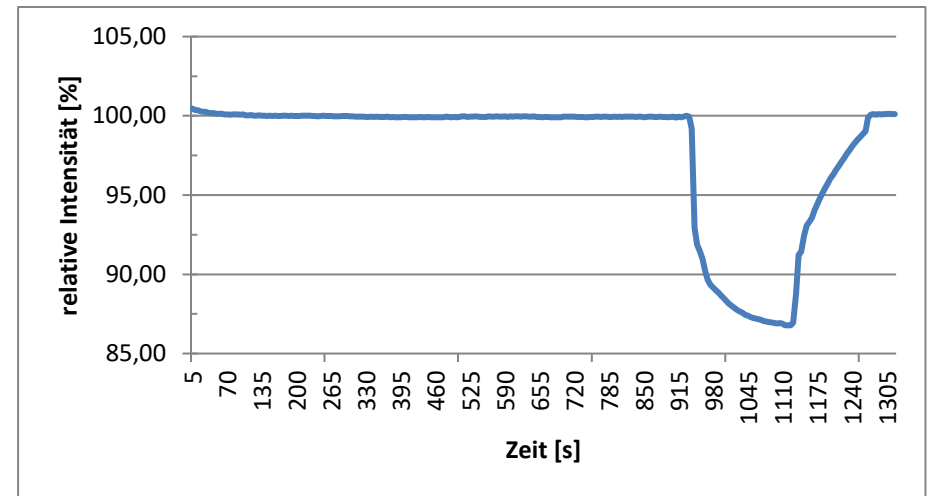


Diagramm 2: Messdaten zu Messung 2

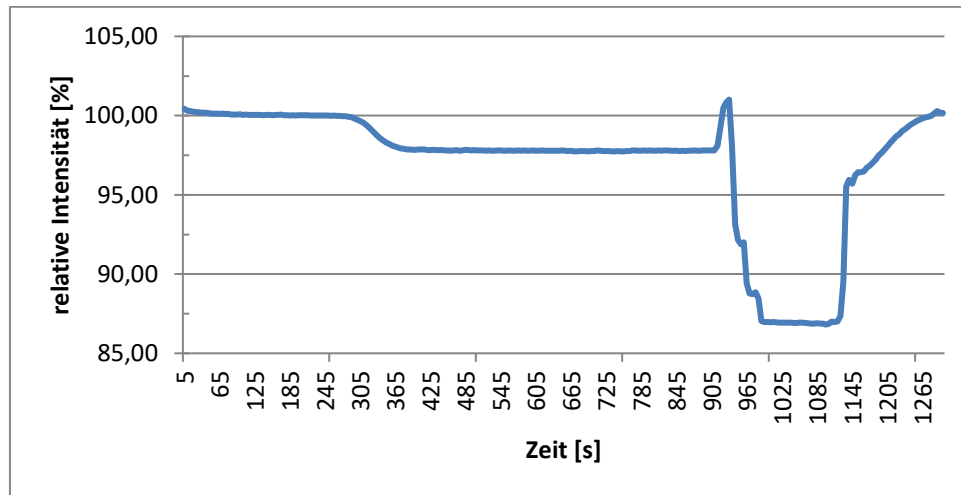


Diagramm 3: Messdaten zu Messung 3

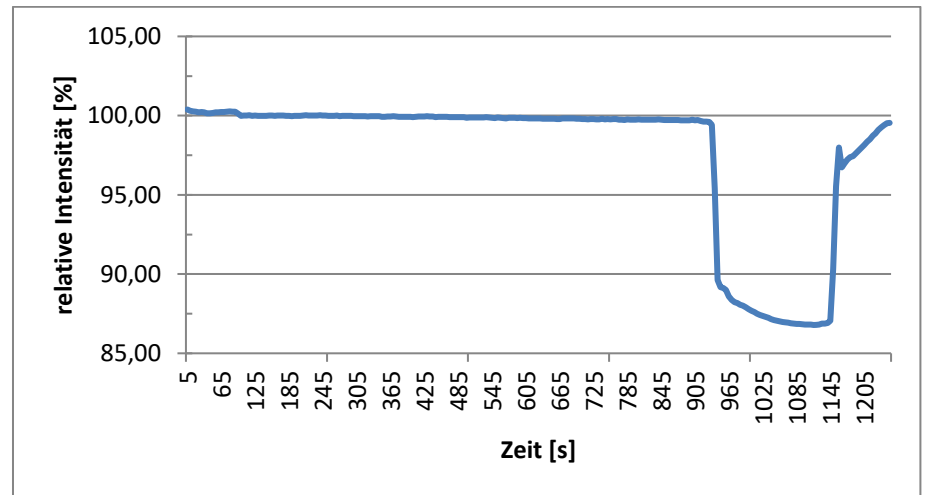


Diagramm 4: Messdaten zu Messung 4

Diskussion der Messungen und Vergleich der Messkurven:

Es lässt sich sagen, dass alle Messungen in etwa demselben Muster folgen. In den ersten 75 Sekunden sollte die Messlinie in etwa waagrecht verlaufen. Hier wurde eine erste Baseline aufgezeichnet. Zu Beginn jeder Messung fallen die Kurven leicht ab.

Im anschließenden Zeitraum bis etwa 750 Sekunden erfolgt die Messung mit der entsprechenden Probe. Hier verhalten sich die Kurven weiterhin waagrecht bzw. waagrecht verschoben wie in Messung 3. In diesem Zeitraum binden die Antikörper in den Lösungen mit den Testosteronderivaten auf der Sensoroberfläche.

Der folgende Abschnitt verläuft bis 900 Sekunden. Hierbei wird erneut die PBS-Lösung angeschlossen und eine weitere Baseline aufgezeichnet. Dementsprechend verlaufen die Messkurven weiterhin waagrecht, d.h. mit konstanter Intensität. In Messung 1 ist bei etwa $t = 800s$ eine deutliche Abweichung nach oben zu erkennen. Dieses Verhalten wurde durch eine Luftblase, die in das System gelangt ist erzeugt. Nachdem die Blase das System passiert hatte hat sich der Messwert wieder der „normalen“ Messkurve angepasst ($t = 910s$)

Im anschließenden Abschnitt bis etwa 1100 Sekunden wurde der Transducer mit Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl) gespült. Hierbei wurden die gebundenen Antikörper von der Sensoroberfläche gespült. Zu beobachten ist ein spontaner, deutlicher Abfall der Messkurven auf etwa 88%.

Abschließend wurde eine weitere Baseline mit PBS-Puffer aufgenommen. Hier stellen sich die Messkurven etwa wieder auf die Messwerte der ersten Baseline ein. Nachdem sich ein konstantes Messsignal eingestellt hatte wurde die Messung gestoppt.

Für den Vergleich der Messungen werden die passenden Messreihen 1 und 4, bzw. 2 und 3 übereinander gelegt. Der erwähnte Ausschlag der Messung 1 aufgrund von Luftblasen wird zum besseren Vergleich abgeschnitten.

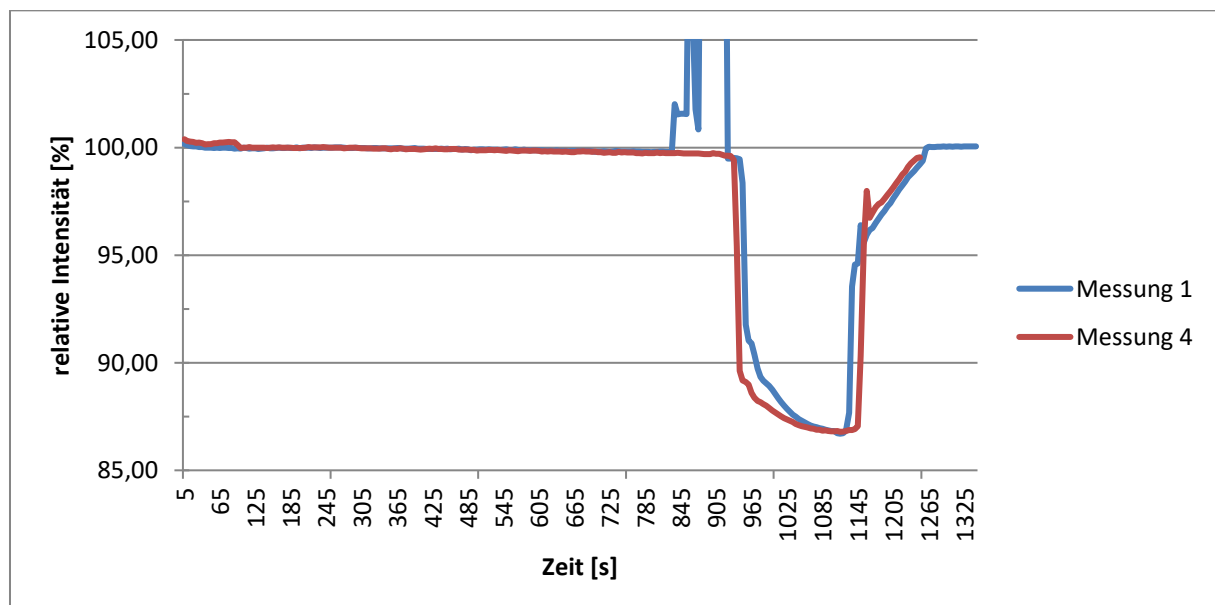


Diagramm 5: Vergleich der Messungen 1 und 4

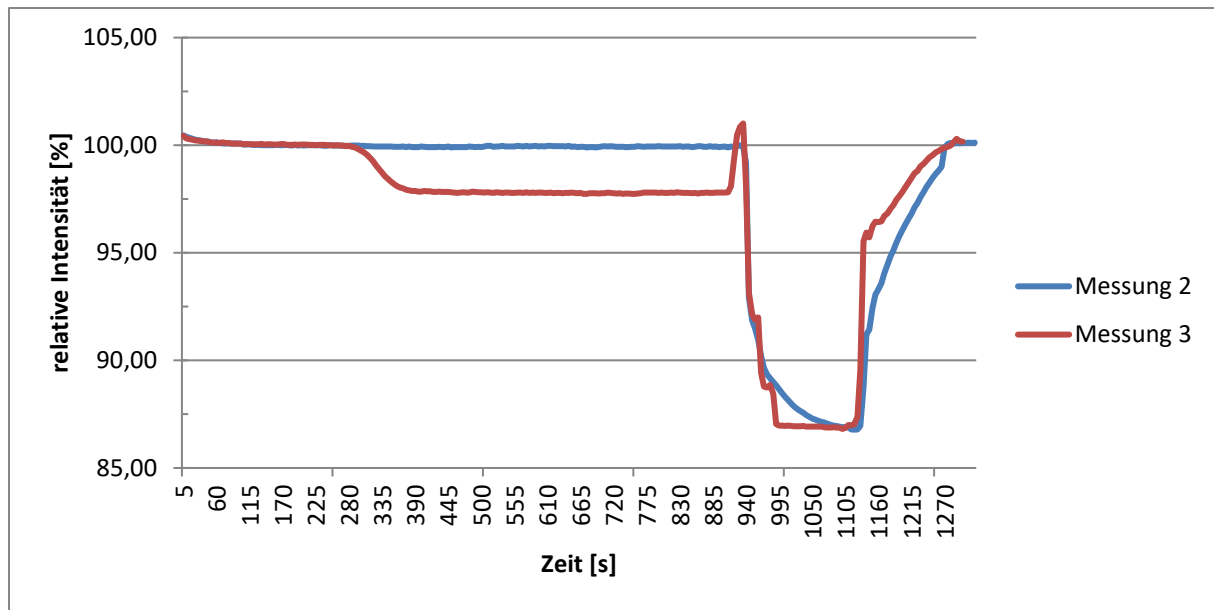


Diagramm 6: Vergleich der Messungen 2 und 3

Bis auf den bereits angesprochenen Ausbruch der Messkurve 1 verlaufen die Messungen 1 und 4 nahezu identisch. Auch die Kurven zu Messung 2 und 3 laufen sehr ähnlich. Messung 3 benötigt etwas mehr Zeit um den Messwert der Baseline nach der Regenerationsphase zu erreichen. Ein weiterer Unterschied ist die Parallelverschiebung der Messkurve 3 in den Zeitbereichen 2 und 3 (Probeninjektion und zweite Baseline) um etwa -2,5%.

Frage 2) Führen Sie zwischen $t = 250 \text{ s}$ und $t = 500 \text{ s}$ einen linearen Fit durch und geben Sie die jeweilige Steigung an. Wie könnten Sie Ihre Kurven alternativ noch auswerten, um ein konzentrationsabhängiges Signal zu erhalten?

Mithilfe von Origin ergeben sich folgende Messkurven:

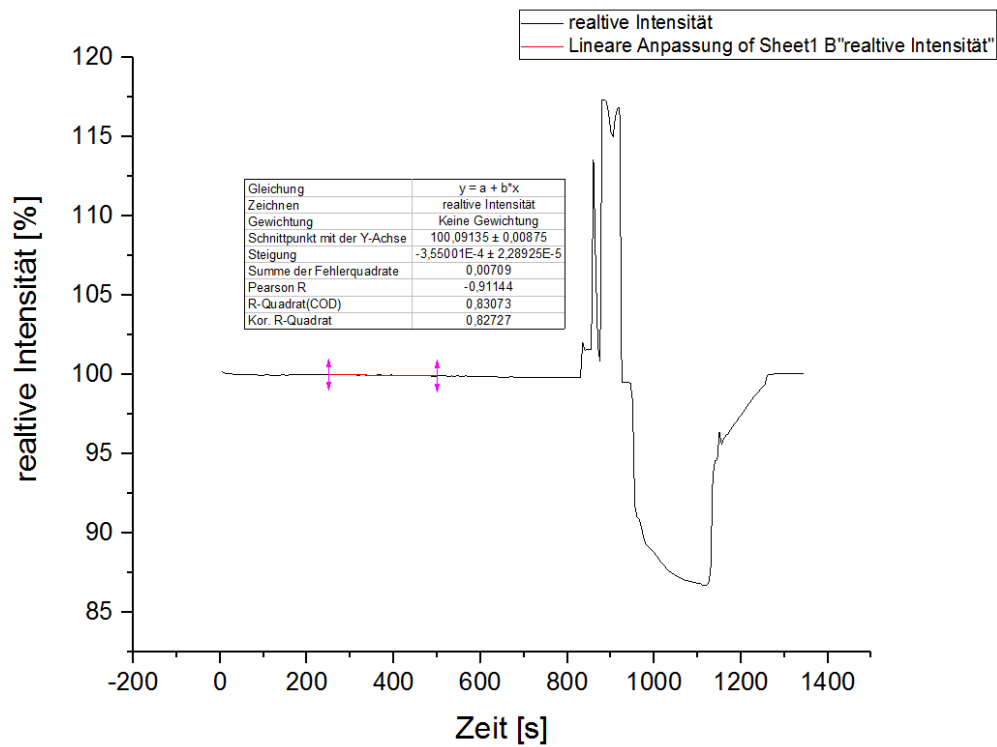


Diagramm 7: Linearer Fit der Messreihe 1

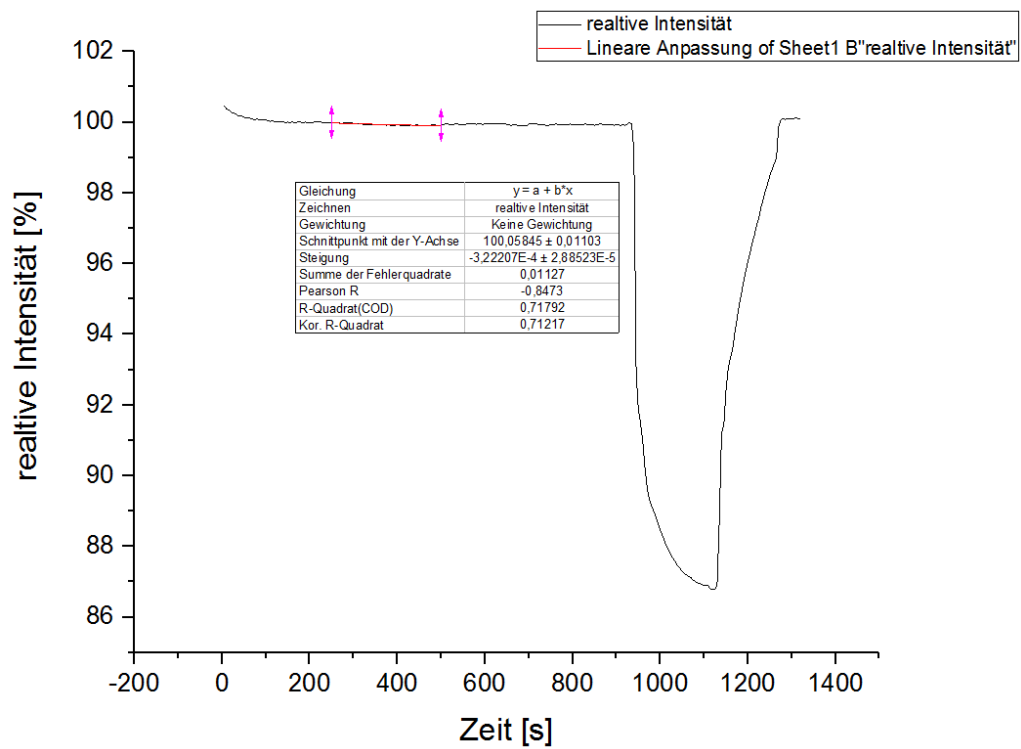


Diagramm 8: Linearer Fit der Messreihe 2

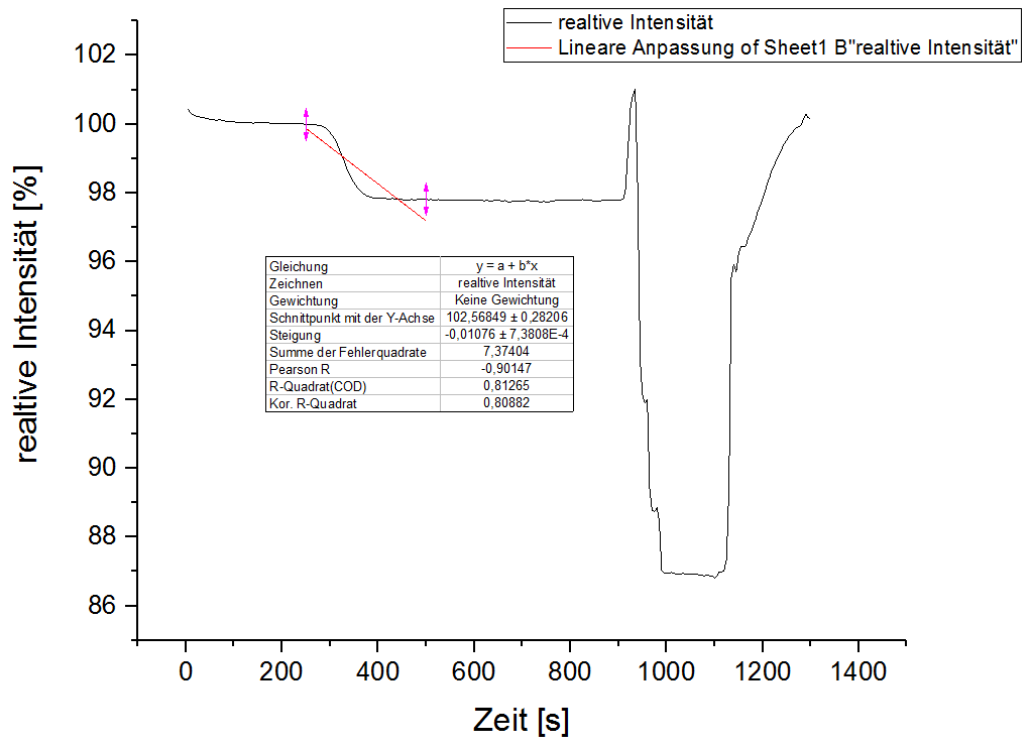


Diagramm 9: Linearer Fit der Messreihe 3

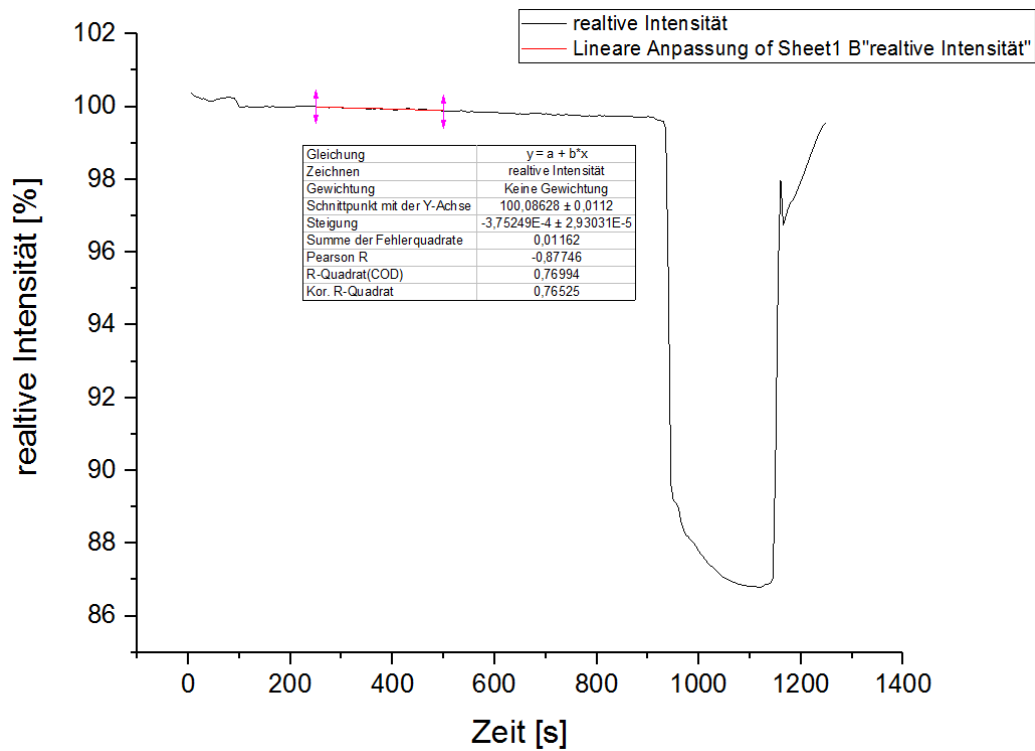


Diagramm 10: Linearer Fit der Messreihe 4

Es ergeben sich folgende Steigungen:

Messung 1	$-3,55 \cdot 10^{-4}$
Messung 2	$-3,22 \cdot 10^{-4}$
Messung 3	-0,01
Messung 4	$-3,75 \cdot 10^{-4}$

Der Vergleich der Steigungen der Vergleichsmessungen zeigt eine Übereinstimmung bis auf $-2 \cdot 10^{-5}$. Messung 3 fällt mit einer Steigung von -0,01 deutlich aus dem Muster. Hier liegt der Fit genau über der Parallelverschiebung beim Übergang in die Phase der Probeninjektion.

Alternativ zum Vergleich der Steigungen könnte auch die Differenz zwischen der ersten und der zweiten Baseline betrachtet werden. Auch hier sind die Messungen 1, 2 und 4 nahezu identisch, während Messung 3 die charakteristische Parallelverschiebung aufweist.

Frage 3) Bestimmen Sie die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus den bereitgestellten Daten für eine Kalibrierkurve. Tragen Sie diese Werte gegen die entsprechenden Konzentrationen auf. Wählen Sie für die Konzentrationsachse eine logarithmische Auftragung. Führen Sie nun mit Origin einen 4-Parameter logistischen Fit durch. Überprüfen Sie, wie gut Ihre Werte mit der Kalibrierfunktion übereinstimmen. Welche Konzentrationen wurden laut Kalibrierfunktion von Ihnen verwendet? Bestimmen Sie die Wiederfindungsrate (WFR).

Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen ergibt:

Testosteron-Konzentration [ng/ml]	Mittelwert [%]	Standardabweichung [%]	Mittelwert auf 100% normiert	Standardabweichung auf 100 % normiert
0	0,0083967	0,000307	100	3,659786
0,5	0,0079000	0,000384	94,08495	4,567719
3	0,0060233	0,000763	71,73482	9,082758
5,7	0,0036867	0,000607	43,90631	7,234789
6	0,0025700	0,001212	30,60738	14,439487
12	0,0005550	0,000115	6,60996	1,365469
100	0,0000791	0,000035	0,94210	0,417676

Daraus lässt sich mithilfe des 4-Parameter logistischen Fits folgende Funktion darstellen:

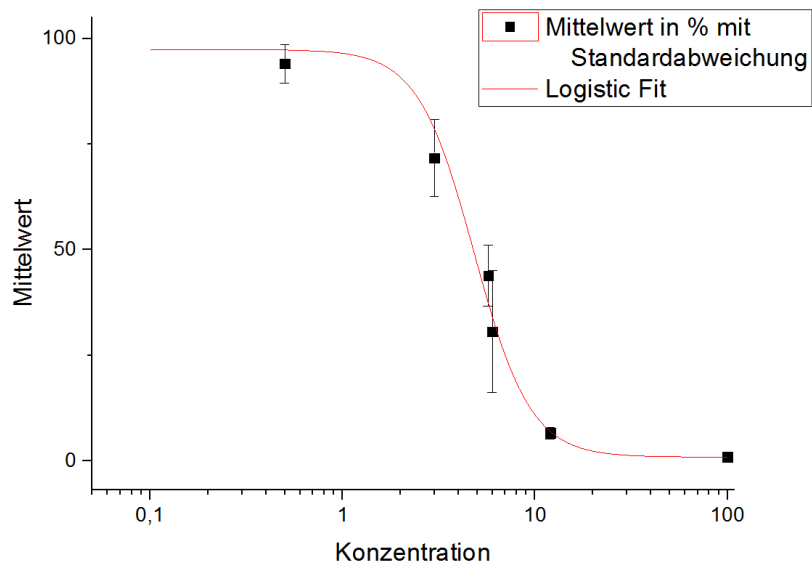


Diagramm 11: Mittelwert-Konzentration-Diagramm mit 4-Parameter Logistic Fit

Mithilfe von Origin können folgende Werte ausgelesen werden:

Obere Asymptote an die Kurve	$A_1 = 97,4189\%$
Untere Asymptote an die Kurve	$A_2 = 0,9063\%$
Testmittelpunkt (Analyt-Konzentration am Wendepunkt)	$x_0 = 4,8312$
Steigung im Testmittelpunkt nach der logarithmischen Transformation	$p = 2,9690$

Des Weiteren wird die jeweiligen Analytkonzentration mit x festgelegt.

Umstellen der Gleichung der Kalibrierfunktion nach x ergibt:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$$

$$x = \sqrt[p]{\frac{A_1 - A_2}{y(x) - A_2} - 1} \cdot x_0 = \sqrt[2,9690]{\frac{97,4189\% - 0,9063\%}{y(x) - 0,9063\%} - 1} \cdot 4,8312$$

Der Mittelwert der Steigungen der Messungen 1 und 4 wird auf 100% gesetzt:

$$s_{1,4} = \frac{1}{2}(-3,55 \cdot 10^{-4} + (-3,75 \cdot 10^{-4})) = -3,65 \cdot 10^{-4}$$

$$|s_{1,4}| = 3,65 \cdot 10^{-4}$$

Somit gilt für Messung 2:

$$y_2(x) = \frac{|s_2|}{|s_{1,4}|} = \frac{3,22 \cdot 10^{-4}}{3,65 \cdot 10^{-4}} \cdot 100 = 88,22 \%$$

und für Messung 3

$$y_3(x) = \frac{|s_3|}{|s_{1,4}|} = \frac{0,01}{3,65 \cdot 10^{-4}} \cdot 100 = 2739,73 \%$$

Über die Gleichung der Kalibrierfunktion ergibt sich die Konzentration

$$x_{2,ist} = \sqrt[2,9690]{\frac{97,4189\% - 0,9063\%}{88,22\% - 0,9063\%} - 1} \cdot 4,8312 = 2,264 \frac{ng}{mL}$$

mit einer Wiederfindungsrate von

$$WFR_2 = \frac{x_{2,ist}}{x_{2,soll}} \cdot 100 = \frac{2,264}{3} \cdot 100 = 75,4\bar{6} \%$$

Bei der Berechnung zu Messung 3 gilt:

$$x_{3,ist} = \sqrt[2,9690]{\left| \frac{97,4189\% - 0,9063\%}{2739,73\% - 0,9063\%} - 1 \right|} \cdot 4,8312 = 4,77 \frac{ng}{mL}$$

Es ergibt sich eine sehr geringe Wiederfindungsrate von

$$WFR_3 = \frac{x_{3,ist}}{x_{3,soll}} \cdot 100 = \frac{4,77}{100} \cdot 100 = 4,77 \%$$

Frage 4) Berechnen Sie die theoretisch nötige Menge an Testosteron, um die eingesetzte Menge an Testosteron-Antikörper vollständig zu inhibieren.

Die Testosteron-Antikörper sollen vollständig inhibiert werden.

Gegeben ist weiterhin: $M_{AG} = 288,42 \frac{g}{Mol}$, $M_{AK} = 150.000 \frac{g}{Mol}$

Verwendet wurden 2,5 µg Antikörper.

Die Stoffmenge ergibt sich zu

$$n_{AK} = \frac{m_{AK}}{M_{AK}} = \frac{2,5 \cdot 10^{-6} g}{150000 \frac{g}{mol}} = 1,6 \cdot 10^{-11} mol.$$

Da die Antikörper eine Y-Struktur vorweisen kann jeder Antikörper zwei Testosteron-Antigene binden. Somit gilt $n_{Ag} = 2 \cdot n_{Ak}$.

D.h. für die Masse gilt $m_{Ag} = n_{Ag} \cdot M_{Ag} = 2 \cdot n_{AK} \cdot M_{AG} = 9,614 \cdot 10^{-9} g = 9,614 ng$.

Die benötigte Menge an Testosteron beträgt also 9,614 ng.