

Theorie

1. Zielsetzung und Lehrinhalte

Die Zielsetzung des Versuches „Immunreaktion“ besteht darin, Testosteron als Analyt mit Hilfe eines Immunoassays zu quantifizieren. Hierzu wird der Bindungshemmtest eingesetzt, bei dem verschiedene Konzentrationen einer Testosteronlösung mit spezifischen Antikörpern gepaart werden. Die daraus resultierenden Bindungsereignisse werden mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS) beobachtet.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Immunoassays

Ein Immunoassay ist ein Testverfahren, das auf der spezifischen Reaktion zwischen Antigen und Antikörper basiert. Hierbei dient das Antigen als Analyt, während der Antikörper die Erkennungsstruktur darstellt. Diese Struktur wird meist auf einer Sensoroberfläche immobilisiert, sodass der Analyt daran binden kann. Antikörper können aber auch in der Lösung sein und die Antigene sind auf der Oberfläche. Immunoassays können einfache Ja/Nein-Fragen beantworten, die Quantifizierung von Stoffen ermöglichen oder detaillierte Charakterisierungen bestimmter Substanzen durchführen. Voraussetzung für ihren Einsatz ist, dass der Analyt eine eindeutige chemische Struktur besitzt, um eine spezifische Bindung zu gewährleisten. Immunoassays sind besonders vorteilhaft, wenn der Analyt nicht direkt nachweisbar ist oder wenn eine genaue Identifikation in komplexen Proben wie Blut erforderlich ist.

2.2 Testformate

Immunoassays nutzen verschiedene Testformate, die entweder markierungsfrei sind oder Marker verwenden, um Analyt-Antikörper-Bindungen nachzuweisen. Generell wird hier zwischen drei verschiedenen Testformaten unterschieden.

Das direkte Testformat ist eine markierungsfreie Methode, bei der die Erkennungsstruktur, in diesem Fall Antikörper, auf einer Sensoroberfläche fixiert wird. Die Analytlösung wird auf die Sensoroberfläche aufgetragen, wodurch die Bindung des Analyten an die Antikörper gemessen wird. Änderungen an der Oberfläche, wie der Brechungsindex, machen die Bindung sichtbar. Das direkte Testformat ist zwar oft günstiger, jedoch hat er auch eine schlechtere Nachweisgrenze.

Beim Sandwich-Assay wird die Sensoroberfläche zunächst mit Fangantikörpern beschichtet, die den Analyten binden. Danach wird ein Detektionsantikörper hinzugefügt, der spezifisch markiert ist und ebenfalls an den Analyten bindet. Diese Methode ist sehr spezifisch und empfindlich, erfordert jedoch, dass der Analyt mindestens zwei Bindungsstellen besitzt. Außerdem muss das Molekül relativ groß sein.

Der Bindungshemmtest, der in diesem Versuch verwendet wird, funktioniert anders. Hier wird das Antigen, also der Analyt, auf der Sensoroberfläche fixiert. Die zu analysierende Lösung wird zuerst mit Antikörpern vorbehandelt, wodurch ein Gleichgewicht aus Antikörper, Antigen und Antigen-Antikörper-Komplexen entsteht. Diese Lösung wird dann über den

Sensor gegeben. Freie Antikörper binden an die immobilisierten Antigene und werden gemessen. Bei einer hohen Analyt-Konzentration gibt es wenig freie Antikörper, was zu einem kleinen Signal führt, und umgekehrt. Dieser Test funktioniert für kleine Moleküle.

2.3 Reflektorische Interferenzspektroskopie

Die reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) ist eine markierungsfreie Detektionsmethode, die auf der Mehrfachreflexion von Weißlicht an dünnen Schichten basiert. Diese Methode wird verwendet, um die optische Schichtdicke von durchsichtigen Schichten zu bestimmen, indem Interferenzeffekte genutzt werden.

Weißes Licht, das auf die Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices trifft, wird teilweise zurückgeworfen. Zwischen den zurückgeworfenen Teilstrahlen kommt es zu einer Phasenverschiebung $\Delta\phi$. Die Teilstrahlen überlagern sich und zeigen Interferenz. Die durch konstruktive und destruktive Interferenz hervorgerufene Änderung der Intensität wird Interferenzspektrum genannt.

Bei senkrechtem Lichteinfall, in nicht absorbierenden Schichten mit geringer Reflektivität und ohne Phasensprünge während der Reflexion, ergibt sich für die Intensität R folgende Formel:

$$R = R_1 + R_2 + 2\sqrt{R_1 \cdot R_2} \cos\left(\frac{4\pi \cdot n \cdot d}{\lambda}\right)$$

Formel 1

n ist dabei der Brechungsindex, d die physikalische Schichtdicke und λ die Wellenlänge des einfallenden Lichts.

Bei RIFS wird die Verschiebung der Interferenzspektren genutzt, um Änderungen in der optischen Schichtdicke nd zu messen. Dies geschieht, durch die Bindung eines Rezeptors an einen Liganden, der auf der Oberfläche fixiert ist. Dadurch verändert sich die Schichtdicke und das Interferenzspektrum verschiebt sich. Diese Bindungsereignisse werden gemessen und als Bindungskurve dargestellt.

2.4 Kinetik und Gleichgewicht

Wechselwirkungen zwischen Antikörper (AK) und Antigene (AG) sind dafür verantwortlich, dass die Testformate funktionieren. Abhängig von den Dissoziations- beziehungsweise Assoziationsraten kommt es zu einem Gleichgewicht zwischen dem Antigen-Antikörper-Komplex und den AK und AG. Aus dem Massengesetz ergibt sich folgend die Gleichgewichtskonstante K , die durch die Bindung ausgedrückt wird:

$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{c_{Ag-Ak}}{c_{Ag} \cdot c_{Ak}} = \frac{c_{Ag-Ak}}{(c_{0,Ag} - c_{Ag-Ak})(c_{0,Ak} - c_{Ag-Ak})}$$

Formel 2

Dabei stehen die Variablen für folgende Größen:

- k_a – Assoziationsratenkonstante
- k_d – Dissoziationsratenkoeffizient
- c_{Ag} – Gleichgewichtskonzentration Antigen
- c_{Ak} – Gleichgewichtskonzentration Antikörper

- c_{Ag-Ak} – Konzentration Analyt-Antikörper-Komplex

Die Gleichgewichtskonstante K enthält nur Informationen über die thermodynamischen Eigenschaften der Wechselwirkung, nicht über die Kinetik. Die Geschwindigkeit zur Bildung des Antikörper-Antigen-Komplexes wird somit durch folgende Formel beschrieben:

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

Formel 3

Schließlich sind also zwei unterschiedliche Effekte für die Geschwindigkeit der Bindung verantwortlich: die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen AK und AG, sowie die Geschwindigkeit der Diffusion der Analytmoleküle zur Oberfläche.

Bei einer kinetisch kontrollierten Reaktion ist die Geschwindigkeit nicht durch die Diffusion limitiert. Die Rezeptormoleküle sind gering auf der Oberfläche beladen, es besteht außerdem eine hohe Analytkonzentration. Für die Bindungsrate ergibt sich:

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

Formel 4

c sei dabei die Konzentration der freien Analytmoleküle, Γ die Beladung der Oberfläche des Sensors und Γ_{max} die komplette Sättigung der Bindungsstellen.

Die Diffusionslimitierte Reaktion dagegen weist eine geringe Konzentration Analytkonzentration und eine hohe Beladung der Rezeptormoleküle auf. Die Reaktion ist, wie der Name schon sagt, durch die Diffusion limitiert. Die Bildungsrate lässt sich hier beschreiben durch:

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

Formel 5

c_v sei dabei die Konzentration im Volumen.

Die Bindungsrate ist bei hohen Maximalbeladungen zu Beginn der Messung von dem Transport zur Oberfläche abhängig. Die Bindungskurve ist durch eine längere lineare Steigerung ausgeprägt. Beispielsweise kann die Konzentration an Rezeptor-Analytkomplexen in der Lösung unter diesen Messbedingungen bestimmt werden. Im Unterschied dazu sind geringe Maximalbeladungen bei der Bestimmung der kinetischen und thermischen Eigenschaften des Bindungsverhaltens von Rezeptoren und Liganden hilfreich.

2.5 Kalibrierung

Um den Gehalt einer Probe mit einem unbekannten Analytgehalt zu quantifizieren, kann eine Kalibrierungskurve erstellt werden. Zur Erstellung dieser Kurve werden eine Reihe an Proben mit bekanntem Analytgehalt aufgenommen und verglichen. So kann die Konzentration des Analyten mit statistischer Unsicherheit in einem kleinen Bereich bestimmt werden. Dabei wird das Signal über die Konzentration auf einer logarithmischen Skala aufgetragen.

Vorfragen

1. Welches Testformat würdet ihr für einen Covid-19-Schnelltests (Lateral Flow Test) verwenden und warum?

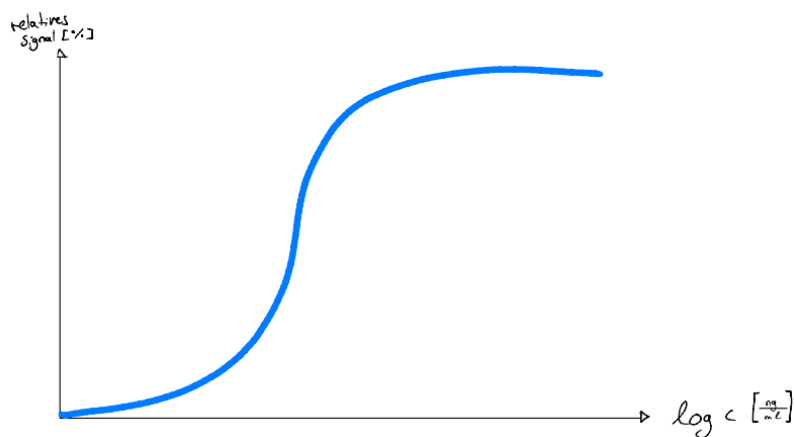
Für einen Covid-19-Schnelltest eignet sich besonders die Sandwich-Assay-Methode. Dies liegt daran, dass die Virus-Antigene große Moleküle mit mehr als einer Bindungsstelle sind. Das Virus wird durch zwei Antikörper detektiert, dadurch entsteht eine hohe Spezifität der Tests. Zudem können die Antigene auch bei einer kleinen Konzentration erkannt werden, die Nachweisgrenze ist somit niedrig.

2. Nennt drei Beispiele für markierungsfreie Detektionsmethoden zur Analyse biomolekularer Wechselwirkungen.

- a) Reflektrometrische Interferenzspektroskopie (RIfS)
- b) Surface Plasmon Resonance
- c) Direktes Testformat

3. Wie würde eine schematische Kalibrierfunktion mit Sandwich-Testformat aussehen? Bitte graphisch und in Worten skizzieren (auf Achsenbeschriftung achten).

Die Kalibrierkurve beginnt bei niedrigen Analytenkonzentrationen, das gemessene Signal ist hier ebenfalls niedrig. Bei steigender Konzentration des Analyten steigt auch das gemessene Signal. Am Anfang steigt die Kurve kaum an, später hat die Kurve Abschnitte, wo die Steigung als linear angenommen werden kann. Am Wendepunkt der Kalibrierkurve sind 50 % der Antikörper gehemmt. Bei hohen Konzentrationen flacht die Kurve wieder ab, da die Bindungsplätze abgesättigt sind und eine weitere Erhöhung der Analytkonzentration das Signal nicht weiter ansteigen lässt. Um den gesamten Messbereich abzudecken, wird die x-Achse logarithmisch skaliert.



4. Befragt eine KI (Chat-GPT, Llama, Bard, ...) eurer Wahl was ein Bindungs-Inhibitions Assay ist, protokolliert den genauen Wortlaut der Frage und Antwort und bewertet die erhaltene Antwort hinsichtlich Korrektheit und Qualität.

Frage: „Was ist ein Bindungs-Inhibitions-Assay?“

Antwort: „Ein Bindungs-Inhibitions-Assay ist eine spezielle Art von Immunoassay, der verwendet wird, um die Menge eines bestimmten Analyten in einer Probe zu bestimmen. Dabei wird die Fähigkeit eines unbekannten Analyten (z.B. ein kleines Molekül oder Antigen) gemessen, die Bindung eines markierten Analyten an einen spezifischen Antikörper oder Rezeptor zu hemmen.“

Für diese Aufgabe befragten wir die KI Chat-GPT. Die KI beschreibt hier grob die Funktionsweise des Bindungshemmtests. Die wesentlichen Punkte wurden erläutert, doch es könnten mehr Details zum Beispiel zum genauen Ablauf des Testes erklärt werden. Der Begriff Analyt wurde kurz eingeordnet, was auch positiv zu bewerten ist. Insgesamt war die Antwort der KI verständlich, jedoch nicht sehr detailliert und spezifisch.

5. Ihr habt eine Testosteron-Stammlösung von 5 ng/mL und euer finales Probenvolumen für eine Messung beträgt 1 mL. In eurem Reaktionsgefäß befinden sich bereits 100 µL anti-Testosteron-Lösung. Wieviel µL Testosteron-Stammlösung und wieviel µL Pufferlösung müsst ihr verwenden, damit eure Probe eine Konzentration von 250 pg/mL Testosteron enthält?

$$\begin{aligned} \text{Stammlösung: } & \overset{\text{Stammlösung}}{C_{st} \cdot V_{st}} = \overset{\text{Probe}}{C_p \cdot V_p} \\ \rightarrow V_{st} &= \frac{C_p \cdot V_p}{C_{st}} \\ &= \frac{0,25 \frac{\text{ng}}{\text{mL}} \cdot 1 \text{ mL}}{5 \frac{\text{ng}}{\text{mL}}} \\ &= 0,05 \text{ mL} \quad \hat{=} 100 \mu\text{L} \end{aligned}$$

$$\text{Pufferlösung: } V_{\text{puf}} = 1 \text{ mL} - 0,05 \text{ mL} - 0,1 \text{ mL} = 0,85 \text{ mL}$$

Versuchsdurchführung

Am Anfang der Versuchsdurchführung haben zunächst die allgemeinen Vorbereitungen stattgefunden. Die Geräte wurden eingeschaltet, die Software gestartet, der Transducer wurde in die Flusszelle gelegt und die Flussrate auf $v=4,5$ eingestellt. Anschließend wurde die Messung gestartet. Der getätigte, genaue Messablauf kann aus der ersten Tabelle entnommen werden. Der Messablauf bleibt identisch, nur die Probelösungen haben sich geändert.

Tabelle 1: Ablauf einer Messung aus der Anleitung

Zeit [mm:ss]	Vorgang	Verwendete Lösung	Anmerkung
00:00 - 01:14	Baseline	PBS	Untersuchung auf Drifteffekte
01:15 - 12:29	Probeninjektion	Probe	Antikörperlösung wird gemessen
12:30 - 14:59	Baseline	PBS	Spülen der Oberfläche
15:00 - 17:59	Regeneration	GdnHCl	Schnell spülen (MAX) bis Signalsprung nach unten! Dann wieder $v=4.5$. Antikörperablösung
18:00 - 20:50	Baseline	PBS	Schnell spülen (MAX) bis Signalsprung nach oben! Dann wieder $v=4.5$. Spülen der Oberfläche

Bei den durchgeführten Messungen war darauf zu achten, dass keine Luftblasen in das System gelangen. Insgesamt wurden vier Messungen durchgeführt: Mit den Leerproben 1 und 2, und jeweils eine Messung mit einer Probe un-/bekannter Antigen-Konzentration aber definierter Antikörper Menge.

Die Leerprobe 1 enthielt 1 mL einer $2,5 \mu\text{g/mL}$ Anti-Testosteron-Antikörper-Lösung. Anschließend wurde er Bindungshemmtest durchgeführt. Die Analytkonzentration wurde von unserem Betreuer vorgegeben, sie betrug bei uns: $2,8 \text{ ng/mol}$. Die Probe wurde 10 Minuten vorinkubiert und die Messung anschließend analog zu den anderen Messungen durchgeführt. Danach sollten wir die Testosteron-Konzentration einer unbekannten Probe bestimmen. Auch hier wurde die Probe 10 Minuten vorinkubiert. Bei der letzten Messung, die Leerprobe 2, wiederholten wir wie gewohnt die Schritte der Messung, hier wurde eine reine Antikörperlösung benutzt, analog zur ersten Leerprobe.

Nach dem Versuch wurden die Schläuche mit PBS gereinigt und anschließend Luft in die Schläuche „reingesogen“. Abschließend wurden die Messungsdaten gespeichert.

Auswertung

Aufgabe 1

Im Folgenden sind die Messungen graphisch dargestellt. Die Diagramme wurden mit Hilfe von Excel erstellt.

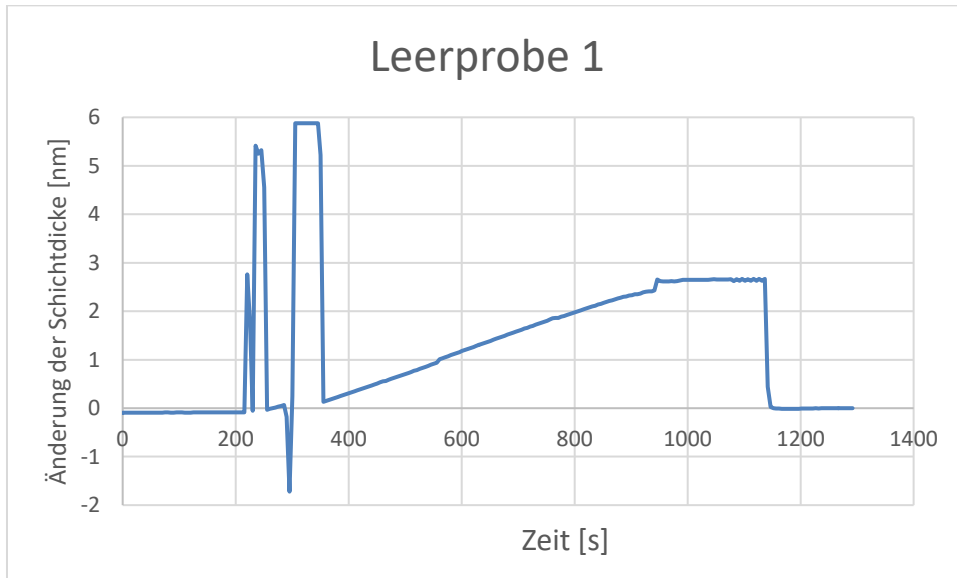


Abbildung 2: Messerwerte der Leerprobe 1

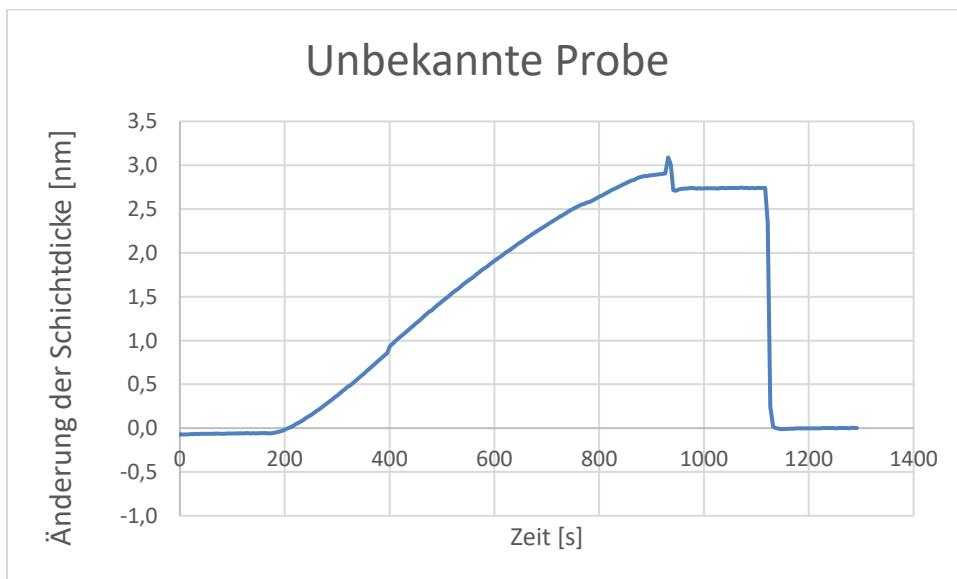


Abbildung 3: Messerwerte der Probe mit unbekannter Testosteronkonzentration

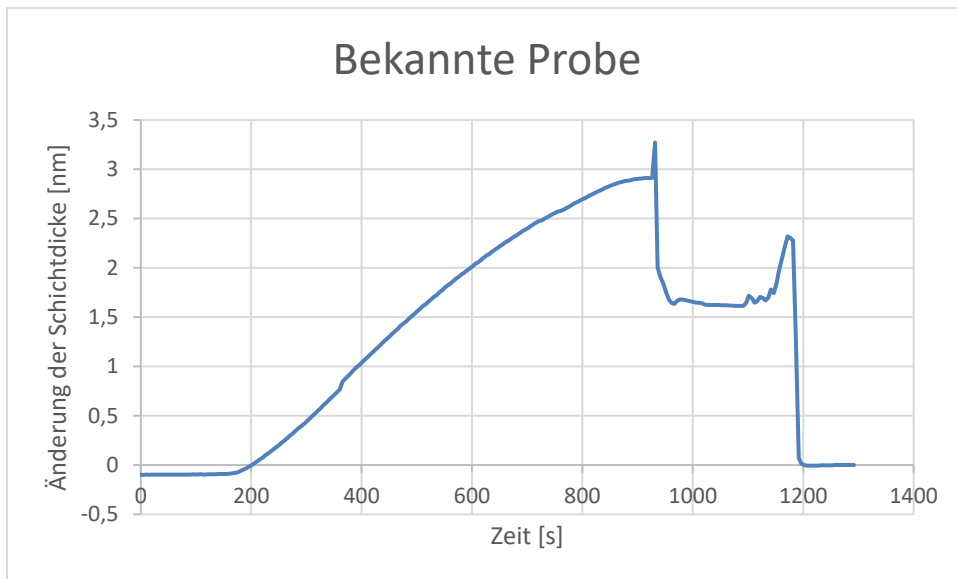


Abbildung 4: Messerwerte der Probe mit bekannter Testosteronkonzentration

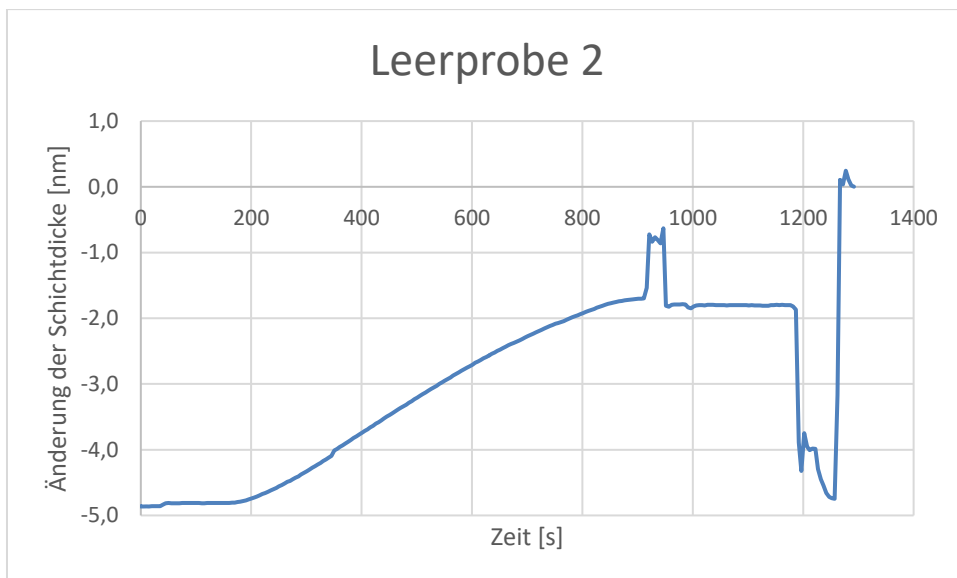


Abbildung 5: Messerwerte der Leerprobe 2

In den Diagrammen ist ersichtlich, dass sie alle etwas unterschiedlich aussehen, doch im Grunde ähnlich aufgebaut sind. Anfangs haben die ersten drei Kurven einen geraden Verlauf, die **Schichtdicke ist zunächst bei 0 nm**, da der Transducer mit PBS-Lösung umspült wird. Dies dient dazu, den Transducer auf mögliche Qualitätsmängel zu untersuchen. Wir können schon jetzt sagen, dass bei der Messung von Leerprobe 2 etwas schiefgelaufen ist, da die anfängliche Schichtdicke nicht bei 0 nm, sondern bei -5 nm beginnt. Eine mögliche Erklärung ist es, dass das Programm nicht richtig aufgezeichnet hat. Außerdem hatten wir Probleme mit dem Verbindungsschlauch, dieser riss mehrmals ab. Die Kurve der Leerprobe 2 scheint allgemein um die anfangs erwähnten -5 nm auf der Y-Achse nach unten verschoben zu sein, da der weitere Kurvenverlauf ins erwartete Schema passt. Nach 1 Minute und 14 Sekunden, laut Anleitung, wurde der Schlauch für knapp elf Minuten von der PBS-Lösung in die zu messende Probe gesteckt. Hierbei fällt die erste Leerprobe, zwischen den Sekunden 200 bis 400, aus dem Muster. Normalerweise sollte die Kurve einen **linearen oder quadratischen Anstieg** aufzeigen, wie bei den anderen drei Proben. Der Anstieg wird erklärt durch die

Bindung der Antikörper an die Analyten. Die Schichtdicke wird somit vergrößert, der Graph steigt an. Doch bei der Leerprobe 1 zeigen sich hohe, unerwartete Ausschläge der Kurve. Dies liegt daran, dass wir während der Messung Luft in den Schlauch bekommen haben, da wir beim Umstecken des Schlauches zu langsam agierten. Nach Ablauf der Zeit wird die Oberfläche für knapp zweieinhalb Minuten erneut mit PBS umspült. Durch die Umspülung können keine Antikörper mehr an das Testosteron binden, die Dicke der Schicht steigt nicht mehr an, die Kurve flacht allmählich ab. Anschließend wird die Sensoroberfläche innerhalb von ca. 3 Minuten durch die Umspülung mit GdnHCl regeneriert. Auch an dieser Stelle ist vor allem die Leerprobe 1 nicht ganz wie erwartet. Im Gegensatz zu den anderen Messkurven zeigt sie einen sehr geringen An- und anschließenden Abstieg der Kurve. Die Messungen zeigen bei ungefähr 940 Sekunden alle einen Ausschlag nach oben an, der womöglich durch die kurzzeitige Verdickung der Schicht, durch die Umspülung, zustande kommt. Danach kommt es jedoch schnell zu einem Fall der Kurve, da sich die gebundenen Antigene und Antikörper wieder trennen. Die Unterschiede lassen sich auch hier durch zu langsames Umstecken erklären. Außerdem hatten wir das Problem, dass bei der MAX-Funktion der Pumpe, die bei der Regeneration und abschließenden PBS-Umspülung benutzt wurde, einerseits nicht gleich lang gedrückt wurde und andererseits unser Schlauch bei der bekannten Probenmessung und bei der Leerprobe 2 häufiger Abriss. Somit kam es zu Messungenauigkeiten und den nicht passenden, sehr hohen Ausschlägen in den Kurven. Die Messung der bekannten Probe zeigt dabei bei der Sekunde 1170 einen erneuten Peak, obwohl ein weiterer Abfall, bis zur Baseline (0 nm) zu erwarten wäre. Vor allem unsere letzte Messung zeigt einen sehr hohen Peak um die Sekunden 1200 bis 1300. Am Ende sollten die Kurven im Idealfall aussehen wie die Baseline in der ersten Messphase bis Sekunde 74, sodass sich die Kurven 0 nm annähern sollten. Bei der Leerprobe 2 war dies nicht der Fall. Die anderen drei Messungen, nähern sich alle der Schichtdicke 0 nm an.

Zusammengefasst haben die Messergebnisse grob unseren Erwartungen entsprochen, es gab jedoch, vor allem anfangs bei der Leerprobe 1, am Ende der bekannten Probe und bei der Leerprobe 2 große Messfehler, die teilweise zu hohen Abweichungen geführt haben. Diese waren, wie bereits erwähnt, der Lufteintritt bei Leerprobe 1 während des ersten Umsteckens des Schlauches, sowie der mehrmalige Abriss der Schlauchverbindung während der letzten Messphase bei der zweiten Leerprobe und der bekannten Probe. Doch auch bei den anderen Messungen kam es durch zu langsames Umstecken oder Verunreinigungen zu Abweichungen. Insgesamt müssten nach der Theorie die beiden Leerproben gleich aussehen. Sie weichen jedoch sehr stark voneinander ab.

Aufgabe 2

Anschließend wird bei jeder Probe ein linearer Fit im Bereich der linearen Anlagerung gemacht. Dies wurde mit Hilfe von Origin gemacht.

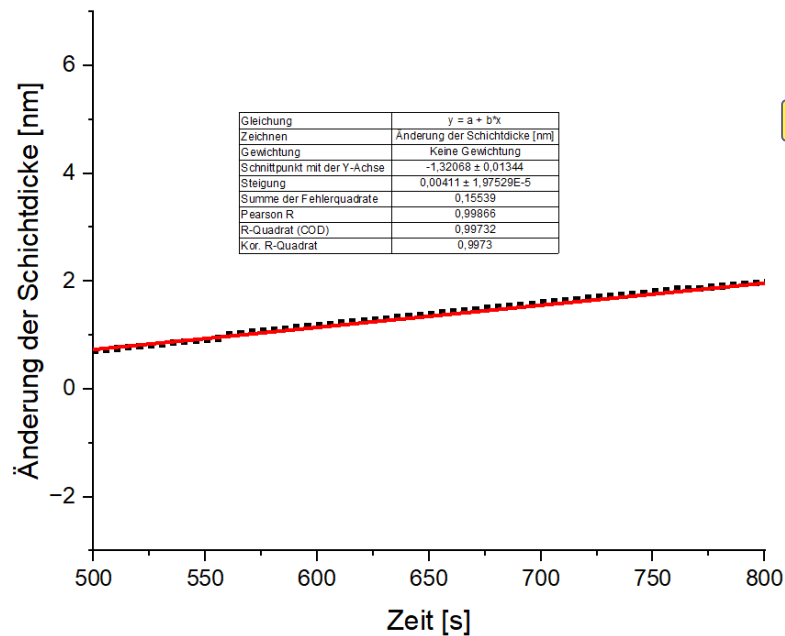


Abbildung 5: Linearer Fit der Leerprobe 1

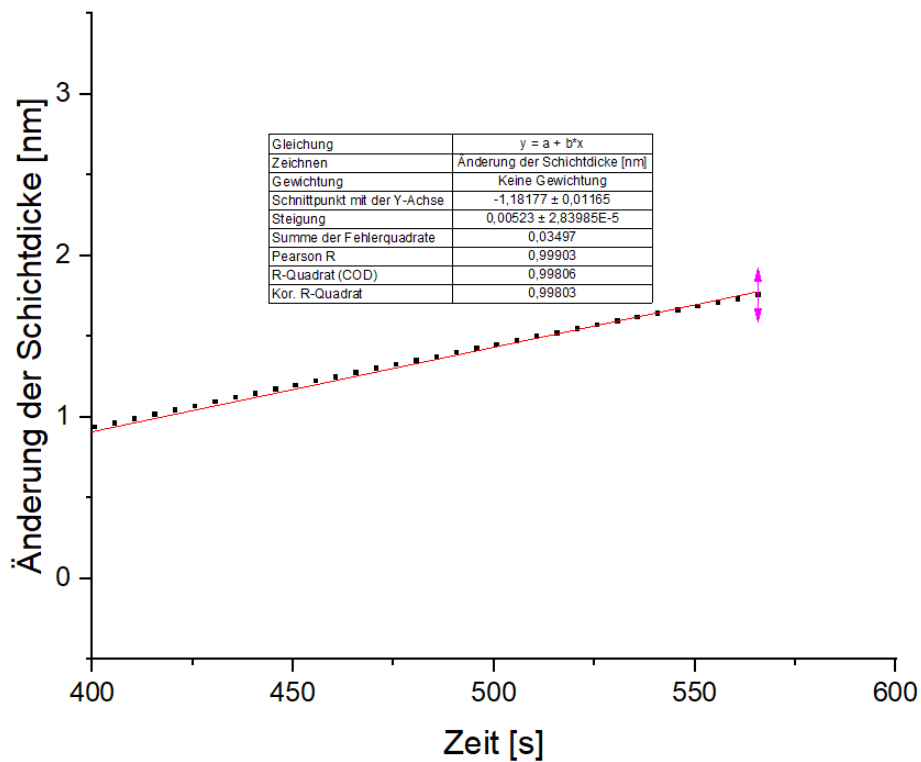


Abbildung 6: Linearer Fit der Probe mit unbekannter Testosteronkonzentration

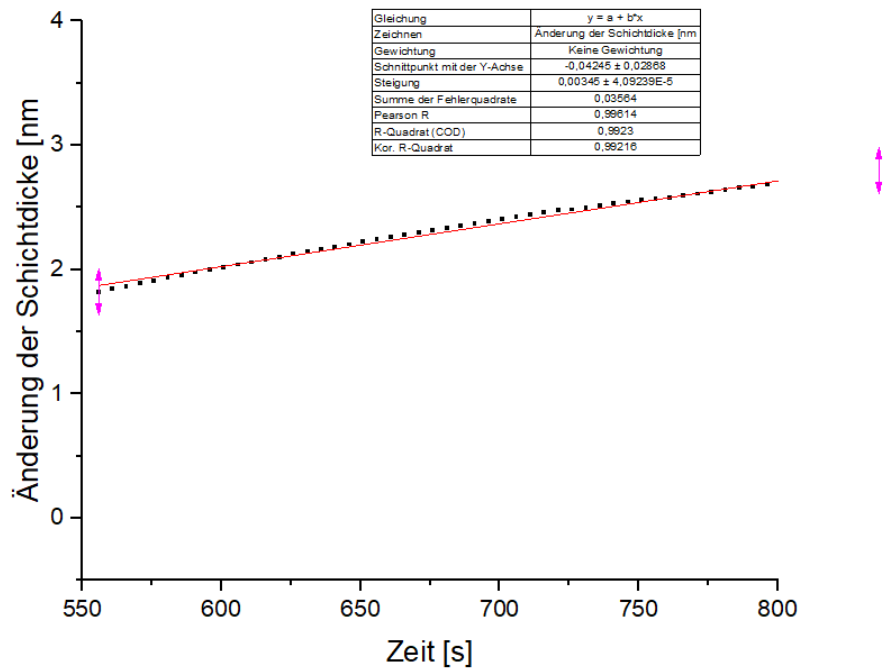


Abbildung 7: Linearer Fit der Probe mit bekannter Testosteronkonzentration

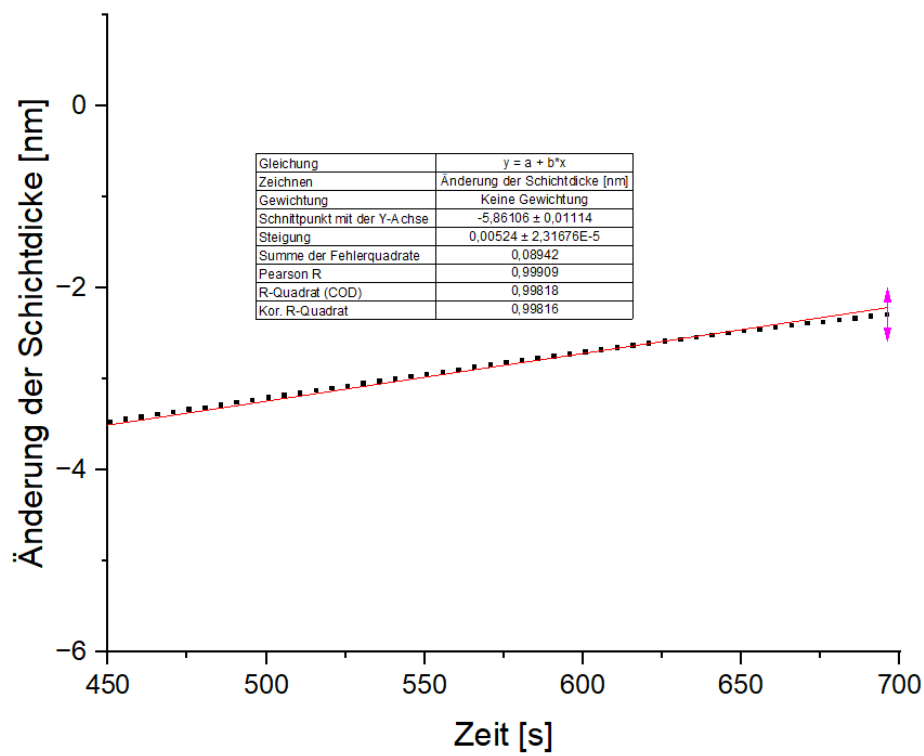


Abbildung 8: Linearer Fit der Leerprobe 2

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Steigung der Proben:

Tabelle 2: Überblick über die Steigungen der linearen Fits

Probe	Leerprobe 1	Unbekannte T.konzentration	Bekannte T.konzentration	Leerprobe 2
Steigung [nm/s]	0,00411	0,00345	0,00523	0,00524

Theoretisch müssten die Steigungen von beiden Leerproben gleich sein. Man erkennt jedoch, dass sich diese in der Steigung unterscheiden, obwohl sie beide mit denselben Konzentrationen von Antikörpern durchgeführt wurden. Insgesamt handelt es sich zwischen der ersten und vierten Messung um eine Differenz von 0,0013. Man kann außerdem erkennen, dass auch die Steigung unserer bekannten Testosteronkonzentrationsprobe (2,8 ng/ml) höher ist als die der unbekannten Probe. Da wir einen Bindungshemmtest durchführten, muss also in der Theorie die Analyt-Konzentration bei der unbekannten Probe höher sein als die der anderen Proben.

Man kann die Kurven auch anders auswerten, um ein konzentrationsabhängiges Signal zu erhalten. Alternativ bietet es sich auch an, die **Differenz der Schichtdicke** auszurechnen. Umso größer die Schichtdicke ist, desto geringer ist die Konzentration der Probe.

Aufgabe 3

Bei dieser Aufgabe berechnen wir zunächst die Mittelwerte und die Standardabweichungen der unterschiedlichen Kurven. Hierfür benutzen wir Excel:

Tabelle 3: Gegebene Testosteronkonzentrationen und relative Steigungen M1, M2, M3

Testosteron-Konzentration [ng/ml]	Betrag relative Steigung M1 [%]	Betrag relative Steigung M2 [%]	Betrag relative Steigung M3 [%]
0	0,00973	0,00931	0,00955
0,5	0,00966	0,00921	0,00857
3	0,00814	0,00781	0,00832
5,7	0,00597	0,00609	0,00636
6	0,00573	0,00533	0,00614
12	2,19E-03	2,11E-03	1,81E-03
100	1,36E-03	1,22E-03	1,45E-03

Tabelle 4: Berechnete Mittelwerte und Standardabweichungen durch Excel

Testosteron-Konzentration [ng/ml]	Mittelwert [%]	Standardabweichung [%]	Mittelwert auf 100% normiert	Standardabweichung auf 100 % normiert
0	0,00953	0,000210713	100	2,211050106
0,5	0,009146667	0,000547753	95,97761455	5,747670364
3	0,00809	0,00025865	84,88982162	2,714064461
5,7	0,00614	0,00019975	64,42812172	2,09601095
6	0,005733333	0,00040501	60,16089542	4,249845624
12	2,04E-03	2,00E-04	2,14E+01	2,102130703
100	1,34E-03	0,000115902	1,41E+01	1,216183186

Nun führen wir mit Origin einen 4-Parameter logistischen Fit durch. Dadurch entsteht folgende Kurve:

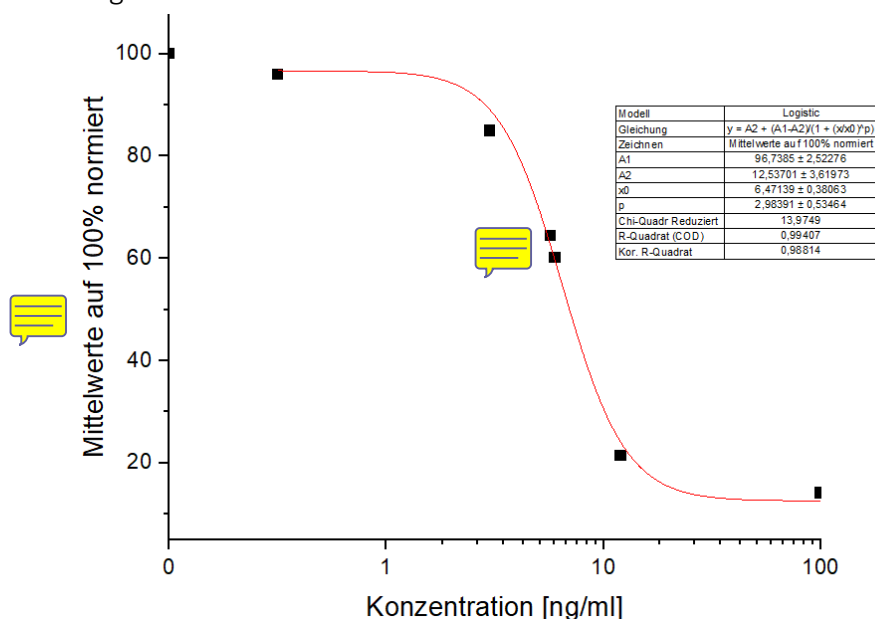


Abbildung 6: Mittelwert gegen Konzentrationen im 4-Parameter logistischen Fit aufgetragen

Mit Hilfe von Origin können wir die folgenden Werte aus der Formel 6 ablesen:

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

mit: A_1 : obere Asymptote an die Kurve
 A_2 : untere Asymptote an die Kurve
 x : Analyt-Konzentration
 x_0 : Testmittelpunkt (Analyt-Konzentration am Wendepunkt)
 p : Steigung im Testmittelpunkt nach der logarithmischen Transformation

Abbildung 7: Funktionsformel aus der Anleitung für 4-Parameter logistischen Fit, Formel 6

Wir erhalten:

$$A_1 = 96,7385\%$$

$$A_2 = 12,53701\%$$

$$x_0 = 6,47139$$

$$p = 2,98391$$

Damit wir überprüfen können, wie gut die Kalibrierfunktionen übereinstimmen, berechnen wir zunächst den Mittelwert der beiden Leerproben und normieren die gesamten Ergebnisse auf den berechneten Wert.

Der Mittelwert der Leerproben beträgt:

$$\frac{(0,00411+0,00524) \text{ nm/s}}{2} \approx 0,00468 \text{ nm/s}$$

Die anderen Werte werden analog berechnet. Somit ergibt sich folgende Tabelle:

Tabelle 5: Normierte Steigungen der Messungen

Messungen	Steigung [nm/s]	Steigung auf 100% normiert (y(x))
Leerprobe 1 und 2	0,00468	100%
Messung 2	0,00345	74%
Messung 3	0,00523	112%

Es ist außerdem nach der Konzentration gefragt, wir stellen hierfür die Formel 6 aus der Abbildung 7 nach x um, sodass wir folgende Berechnung erhalten:

$$x = \sqrt[p]{\frac{A_1 - A_2}{y(x) - A_2} - 1} \cdot x_0$$

Formel 7

Für $x_{L1,L2}$ erhalten wir, nach einsetzen der Werte aus der Kurve:

$$= \sqrt[2,98]{\frac{96,74\% - 12,54\%}{100\% - 12,54\%} - 1} \cdot 6,47 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$$

$$\approx 2,15 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$$

Analog dazu berechnen wir die gesuchte Konzentration der unbekannten Probe (Messung 2):

$$x_2 = \sqrt[2,98]{\frac{96,74\% - 12,54\%}{74\% - 12,54\%}} - 1 \cdot 6,47 \frac{\text{ng}}{\text{ml}} \approx 4,63 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$$

Die gesuchte Konzentration beträgt also $4,63 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$.

Es soll für die dritte Messung mit bekannter Testosteronkonzentration noch die Wiederfindungsrate WFR bestimmt werden. Wir benötigen zunächst analog zur Formel 7 die Konzentration, anschließend berechnen mit der gegebenen Formel 8 WFR:

$$x_3 = \sqrt[2,98]{\frac{96,74\% - 12,54\%}{112\% - 12,54\%}} - 1 \cdot 6,47 \frac{\text{ng}}{\text{ml}} \approx 3,45 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$$

x_3 sei nun c_{ist} :

$$WFR = \frac{c_{\text{ist}}}{c_{\text{soll}}}$$

Formel 8

$$= \frac{3,45 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}}{2,8 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}} \cdot 100\% \approx 123,21 \%$$

Die Wiederfindungsrate liegt also bei knapp 123%, das bedeutet, dass man laut des Testes davon ausgehen kann, dass die Messung zuverlässig ist. Die WFR ist hilfreich bei der **Qualitativen** Bewertung von Analysemethoden. Dies lässt sich auf **systematische Fehler** zurückführen. Es stellt sich die Frage, wie es zu dem über 100-prozentigen Ergebnis kam. Fehlerquellen wurden bereits in Aufgabe 1 diskutiert.

Die von einer Frau benötigte Menge an Testosteron liegt ca. bei $0,12 - 0,6 \text{ ng/ml}$. Die eines Mannes liegt bei ca. $3,5 - 10,1 \text{ ng/ml}$ (siehe Quelle). Für eine Frau würden die Messungen auf einen pathologisch erhöhten Wert deuten, welches einer Hormonellen Störung zugrunde liegen kann. Für einen Mann sind die Werte gut, nur die bekannte Konzentration von $2,8 \text{ ng/ml}$ ist niedrig. Dies könnte beispielsweise auf eine Krankheit des Hoden hinweisen, diese produzieren das Hormon.

Aufgabe 4

Nun soll die theoretisch benötigte Menge an Testosteron ausgerechnet werden, die notwendig ist um alle Antikörper zu inhibieren. In der Aufgabe gegeben sind die Werte:

Testosteron: $M_{AG} = 288,42 \text{ g/Mol}$,

Antikörper: $M_{AK} = 156000 \text{ g/Mol}$

$m_{AK} = 2,5 \text{ } \mu\text{g}$

Zunächst berechnen wir mit folgender Formel die Stoffmenge n_{AK} der Antikörper:

$$n_{AK} = \frac{m_{AK}}{M_{AK}}$$

Formel 9

$$\begin{aligned} &= \frac{2,5 \text{ } \mu\text{g}}{156000 \text{ g/mol}} \\ &\approx 1,60 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \end{aligned}$$

Für die Stoffmenge der Antigene multiplizieren wir n_{AK} mal zwei, da das Antikörper durch die gegebene Struktur zwei Bindungsstellen für das Antigen besitzt.

$$\begin{aligned} n_{Ag} &= n_{AK} \cdot 2 \\ &= 1,60 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot 2 \\ &= 3,2 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \end{aligned}$$

Abschließend berechnen wir die gesuchte Testosteronmenge m_{Ag} . Hierfür benötigen wir nochmal die Formel 9. Wir stellen sie zunächst nach m_{Ag} um. Es sei schlussendlich:

$$\begin{aligned} m_{Ag} &= n_{Ag} \cdot M_{Ag} \\ &= 3,2 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot 288,42 \text{ g/mol} \\ &\approx 9,23 \text{ ng} \end{aligned}$$



Quelle

- <https://www.hormonspezialisten.de/sexualhormone/testosteron/> (25.06.24)