

# Kapitel 1

## Einleitung

In Forschung, Technik und Medizin ist die Erfassung von physikalischen, chemischen und biologischen Messwerten ohne Sensoren nicht mehr vorstellbar. Für fast alle Messanforderungen, bei denen es auf eine robuste, einfache, schnelle und präzise Erfassung von Messwerten ankommt, werden heutzutage eine Vielzahl verschiedenster Sensoren eingesetzt. Vor allem die logische Verknüpfung mehrerer Sensorsignale und die elektronische Dokumentation bzw. Auswertung sind entscheidend für die Erfassung dynamischer Vorgänge und erlauben ein schnelles und exaktes Handeln bzw. automatisches Regeln.

Laut einer Umfrage des AMA-Fachverbandes für Sensorik wird für die Sensorik in Deutschland ein Wachstum von 8-10% im Jahr erwartet [1]. Insbesondere sind laut Umfrage im Bereich der Chemo- und Biosensorik, bei der die Technologieentwicklung noch am Anfang ihrer „Karriere“ steht, zweistellige Zuwächse zu erwarten.

Einer der Gründe für den Trend im Bereich der Chemo- und Biosensorik ist, wie erwähnt, dass vor allem die Biosensoren, obwohl die Anwendungsgebiete sehr vielfältig sind, bisher gegenüber z.B. Sensoren im Automobilbereich eher eine untergeordnete Rolle spielen. Dies gilt speziell im Hinblick auf kommerziell erhältliche Biosensoren. Anwendungsgebiete sind unter anderem die klinische Analytik, die Umweltanalytik oder die Lebensmittel- und Bioprozesskontrolle. In der Grundlagenforschung sind innovative Anwendungen zur Entwicklung von Modellen auf molekularer Ebene oder zum Nachweis von Makromolekülen und deren Interaktion in physiologischen Medien interessant. Ein weiterer Grund für die durch-

aus positive Tendenz im Bereich der Chemo- und Biosensoren ist der Wunsch nach einer schnellen und exakten Chemo- bzw. Bioanalytik, mit der chemische und biologische Reaktionen „online“ verifiziert werden können. Die Miniaturisierbarkeit ermöglicht prinzipiell Anwendungen wie implantierbare Biosensoren.

Ein für die Biosensorik sehr spezielles, aber dennoch sehr umfangreiches Anwendungsgebiet ist die Blutanalytik. Dabei ist sowohl der Nachweis von Blutzellen mit bestimmten Eigenschaften als auch der Nachweis von Antikörpern und anderen Blutplasmaeigenschaften bei vielen medizinischen und biologischen Fragestellungen von außerordentlichem Interesse. Neben vielen anderen, meist optischen Ansätzen ist die in dieser Arbeit verwendete Schwingquarztechnik ein Ansatz für einen Sensor für die Blutanalytik.

Schwingquarze bestehen aus piezoelektrischem Material und können deshalb durch eine elektrische Wechsellspannung zu einer mechanischen Scherschwingung angeregt werden. Nahe der mechanischen Resonanzfrequenz besitzen sie eine sehr hohe Frequenzkonstanz. Anwendung finden sie heutzutage als frequenzgebende Bauelemente in elektrischen Schwingkreisen von Messgeräten, Quarzuhren, Funk- und Fernsehgeräten, etc. Die sensorischen Eigenschaften von Schwingquarzen ergeben sich aufgrund der Ausbildung einer stehenden akustischen Welle innerhalb des Schwingquarzes, die auch in die angrenzenden Medien eindringt. Ändern sich die akustischen Eigenschaften des angrenzenden Mediums, so ändert sich die Resonanzfrequenz und/oder die Amplitude der akustischen Welle und aufgrund der elektromechanischen Kopplung auch die entsprechenden elektrischen Größen.

In der Vergangenheit wurden diese sensorischen Eigenschaften von Schwingquarzen zunächst im Hochvakuum zur Bestimmung der abgelagerten Metallschichtdicke während Aufdampfprozessen genutzt. Dabei ist im Vakuum bzw. in Gasphase die Änderung der Resonanzfrequenz proportional zur Massenbelegung durch eine metallische Schicht. Für den Betrieb von einer Schwingquarzoberfläche in Flüssigphase mussten neben speziellen Oszillatorschaltungen Schwingquarzhalterungen konzipiert werden, die einen elektrischen Kurzschluss verhindern und gleichzeitig die akustische Welle nicht zu stark dämpfen. Dadurch wurde es möglich, die Wurzel des Produkts aus Dichte und Viskosität der benetzenden Flüssigkeit, die proportional zu der Änderung der Resonanzfrequenz und der Dämpfung ist, zu bestimmen.

Ein neues Anwendungsgebiet für die Schwingquarzsensoren stellt die Blutanalyse dar. Für einen Nachweis von Blutzellen oder Antikörpern in Vollblut muss dabei die mit Vollblut benetzte Schwingquarzoberfläche mit neu entwickelten spezifischen biologischen Beschichtungen versehen werden. Durch diese spezifischen

biologischen Beschichtungen werden im Idealfall nur Blutzellen mit einer ganz bestimmten Eigenschaft wie z.B. eine bestimmte Blutgruppe oder Antikörper gegen einen ganz bestimmten „Fremdkörper“ wie z.B. Blutzellen mit fremder Blutgruppe an die Schwingquarzoberfläche gebunden. Bei der Bindung des Analyten ändern sich die akustischen Eigenschaften des an der Schwingquarzoberfläche angrenzenden Mediums und der Analyt kann dadurch mit Schwingquarzen nachgewiesen werden. Binden neben dem Analyten noch weitere Blutzellen oder Proteine unspezifisch an die Schwingquarzoberfläche, wird der Nachweis erschwert oder unmöglich.

In der vorliegenden Arbeit wird anhand eines selbstentwickelten, vollautoamtischen Blutanalysegeräts am Beispiel der Blutgruppenbestimmung die Möglichkeiten der Schwingquarzensensorik in komplexen biologischen Matrices, insbesondere in Vollblut aufgezeigt.

Dazu werden im 2. Kapitel zum einen optische und akustische Transduktionsprinzipien von Immunosensoren und deren Funktionsweise beschrieben. Zum anderen werden die heutzutage in der klinischen Diagnostik eingesetzten Blutgruppenbestimmungsverfahren aufgeführt.

In den ersten Abschnitten des 3. Kapitels werden die Sensoreigenschaften von Schwingquarzen näher betrachtet und das Verhalten der Frequenz- und Wirkwiderstandsänderung für viskoelastische Schichtsysteme abgeleitet. Die folgenden Abschnitte befassen sich mit den Eigenschaften von Vollblut, Blutzellen und Antikörpern. Dabei werden die zum Verständnis dieser Arbeit benötigten Grundlagen zum Nachweis von Blutbestandteilen, insbesondere Blutgruppen mit Schwingquarzen geschaffen.

Die Entwicklungsarbeiten und die Charakterisierung des vollautomatischen 2-Kanal Analysegeräts werden in Kapitel 4 vorgestellt.

In Kapitel 5 sind die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten oder weiterentwickelten biologischen Beschichtungskonzepte zur Blutgruppenbestimmung mit Schwingquarzen aufgeführt.

Erste Blutgruppenbestimmungen mit dem entwickelten Blutanalysegerät werden in Kapitel 6 vorgestellt. Das Kapitel gliedert sich in zwei Hauptabschnitte. Der erste Hauptabschnitt befasst sich mit dem Nachweis von bestimmten Blutgruppenantigenen auf der Erythrozytenmembran. Dabei werden die Frequenz- und Wirkwiderstandsspektren mit Hilfe von den in Kapitel 3 aufgeführten Modellen charakterisiert und ein empirisches Modell zur Beschreibung der durch die Erythrozytenankopplung entstehenden biologischen Mehrfachschichtsysteme abgeleitet.

Im zweiten Hauptabschnitt steht der Nachweis von blutgruppenspezifischen Antikörpern im Vordergrund. Am Ende des zweiten Hauptabschnitts wird eine völlig neuartige Methode für die Separation von Blutbestandteilen in Vollblut und für den anschließenden Nachweis der separierten Blutbestandteile mit Schwingquarzen vorgestellt.

Die erreichten Ziele dieser Arbeit und die sich dadurch ergebenden zukünftigen Möglichkeiten für die Blutanalyse mit Schwingquarzen werden in Kapitel 7 diskutiert.

## **Kapitel 2**

# **Stand der Wissenschaft und Technik**

Im ersten Abschnitt werden verschiedene Transduktionsprinzipien von Biosensoren, insbesondere Immunosensoren aufgeführt und der Stand der Wissenschaft und Technik von diesen Prinzipien erläutert. Dabei steht das Transduktionsprinzip massensensitiver akustischer Biosensoren im Vordergrund.

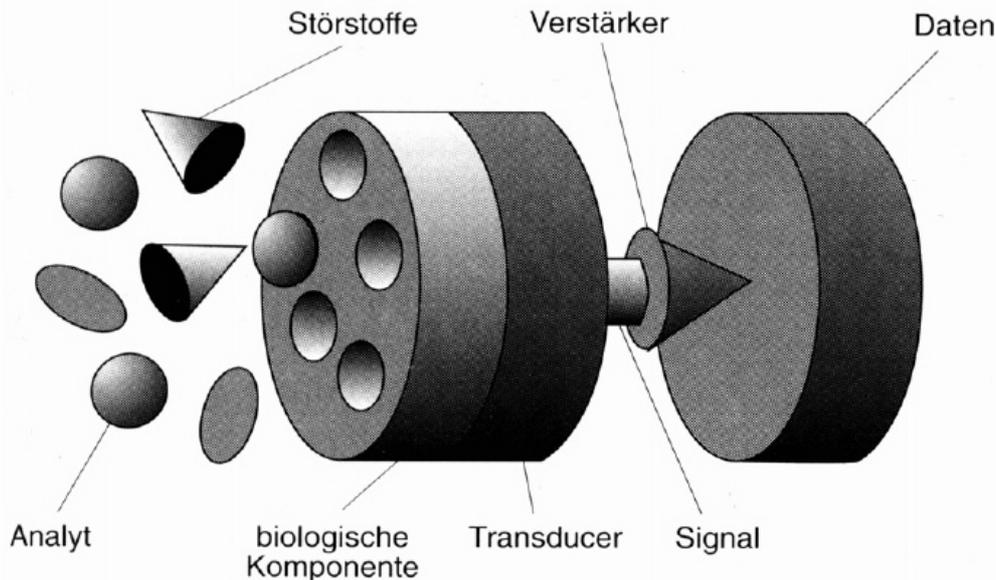
Die historische Entwicklung der Blutgruppenbestimmungsmethoden und konventionelle Blutgruppenbestimmungsverfahren, die heutzutage in der klinischen Diagnostik als Routineverfahren eingesetzt werden, sind Gegenstand des zweiten Abschnitts.

Schließlich befasst sich der dritte Abschnitt mit der Thematik „Schwingquarze als Blutgruppensensoren“.

### **2.1 Biosensoren**

Unter einem Sensor versteht man einen meist miniaturisierten Messwertaufnehmer [2], der aus dem sogenannten Transducer (Signalwandler) und bei Chemo- und Biosensoren aus einer zusätzlichen selektiven Erkennungskomponente besteht (extrinsische Sensoren) (Abbildung 2.1). Die (möglichst) selektive Erkennungskomponente ist eine chemische oder biologische Schicht meist in unmittelbarer

Nähe des Transducers, an der der Analyt selektiv ad- oder absorbiert wird. Diese Wechselwirkung zwischen Analyt und der selektiven Erkennungskomponente wird durch den Transducer in ein elektrisch auswertbares Signal umgewandelt.



*Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines Biosensors [3].*

Die Biosensoren stellen eine Untergruppe der Chemosensoren dar. Die biologische Schicht, die sich bei Schwingquarzen direkt an der Oberfläche des Schwingquarzes (Transducers) befindet, ermöglicht eine selektive Stofferkennung. Idealerweise ist es dadurch möglich, dass aus einer komplexen Probe nur der zu bestimmende Analyt von der selektiven biologischen Schicht „erkannt“ wird und somit der Analyt nachgewiesen werden kann.

Die Analyterkennung geht mit einer physikalischen oder chemischen Änderung der Eigenschaften des Reaktionspartners einher. Neben speziellen Ansätzen, die z.B. Antworten vollständiger Zellen auf Analyten detektieren, unterscheidet man vor allem zwischen den Metabolismus- und Affinitätssensoren.

Der Stoffumsatz findet bei den Metabolismussensoren durch eine chemische Reaktion statt. Als messbares Signal dient die Änderung der chemischen Eigenschaften des Reaktionspartners. Zu der Gruppe von Metabolismussensoren gehören unter anderem Gensonden [3].

Bei den Affinitätssensoren, bei denen kein Stoffumsatz stattfindet, erzeugt die Änderung der physikalischen Eigenschaften oder die Änderung der chemischen

Eigenschaften einer nachgeschalteten Indikatorreaktion ein messbares Signal [3]. Dabei sind Schwingquarze auf Massenänderung und optische Biosensoren auf Änderungen des Brechungsindex sensitiv.

Die Änderung der physikalischen Eigenschaften kommt bei den Immunosensoren durch eine affine Bindung nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ zwischen dem Analyten und einem für diesen Analyten spezifischen Antikörper zu Stande. Diese Reaktion wird als Immunreaktion bezeichnet. Ein Antikörper wird unter anderem vom menschlichen Körper als Immunantwort auf dem menschlichen Körper unbekannte Substanzen gebildet. Immunosensoren sind dabei sehr interessant, da es im Gegensatz z.B. zu Enzymen, die nur für biochemisch wichtige Stoffwechselmetabolite vorkommen, ab einer bestimmten Analytmolekülgröße fast für jeden biologischen Analyten einen entsprechenden Antikörper gibt.

Die folgenden Betrachtungen beschränken sich auf die Transduktionsprinzipien von optischen und akustischen Immunosensoren. Weitere verfügbare Transduktionsprinzipien von Biosensoren und einsetzbare selektive biologische Erkennungskomponenten sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

<i>biologische Erkennungskomponenten</i>	<i>Transducer</i>
Enzyme	optische
Nukleinsäuren	kalorimetrische
Antikörper	akustische (z.B. piezoelektrische)
Rezeptoren	elektrochemische
Lektine	elektrische
Transportproteine	
Zellorganellen	
ganze Zellen	
Mikroorganismen	

**Tabelle 2.1:** Selektive Erkennungskomponenten und Transduktionsprinzipien von Biosensoren [4, 3].

### 2.1.1 Indirekte optische Immunosensoren

Das Prinzip der indirekten optischen Immunosensoren beruht auf der Markierung eines der Reaktionspartner mit einem Enzym oder einem Fluorophor. Zum einen führen diese markierten Reaktionspartner (Konjugat) bei einer Immunreaktion meist nach mehreren Belegungs-, Blockierungs- und Waschvorgängen zu einem Farbumschlag. Zum anderen werden sie durch eine Lichtquelle zur Fluoreszenz angeregt.

Bei niedermolekularen Analyten werden markierte Analytderivate eingesetzt, die in Lösung mit dem Analyten während der Assoziation zum Immunkomplex konkurrieren (kompetitiver Assay). Dabei versteht man unter einer Derivatisierung eine chemische Umsetzung des Analyten unmittelbar vor der Detektion, wodurch eine Quantifizierung des markierten Analyten trotz seiner Reaktivität möglich ist. Das Signal wird photometrisch erfasst und verhält sich umgekehrt proportional zur Konzentration des Analyten. Dazu ist bei einer Fluoreszenzmessung ein optischer Filter bzw. ein Spektrometer nötig, der das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht trennt.

Die ELISA-Methode (Enzym-Linked Immunosorbent Assay) stellt wohl die am besten technisierte/automatisierte Untersuchungsmethode dar. Der Vorteil ist, dass bei einem hohen Probendurchsatz die Immobilisierung in Mikrotiterplatten erfolgt. Dabei können je nach Standardisierung und Testmethode ca. 40 Proben gleichzeitig analysiert werden. Für die „Vor-Ort“-Analyse kommen beschichtete Einweg-Kunststoffröhrchen zum Einsatz, mit denen eine „Ja-Nein“-Aussage getroffen werden kann. Ein Grund für die relativ zögerliche Entwicklung von sensorähnlichen Geräten ist das Problem der Kalibrierung solcher Sensoren. Schwierig ist auch die Vermarktung eines lagerfähigen Massensensors, da enzymmarkierte Verbindungen in der Regel auf einer Temperatur unter 4°C gehalten werden müssen (Abbildung 2.2) [3].

Interessante Immunosensoren, die auf einer indirekten optischen Methode beruhen, sind die Neuentwicklungen IOS (Immun Optischer Sensor) des ICB Münsters [5] und die Capillary Fill Devices [6]. Ein weiterer Echtzeit-Immunosensor-Prototyp des Fraunhofer IPM basiert auf der TIRF-Methode (Total Internal Reflection Fluorescence) [7].

