

Vergleich von Strategien zur Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit Antikörpern für Lateral Flow POCT

Monika Conrad¹, Esteban Builes², Andreas Dietzel², Sven Wagner³, Albert Sill³, Günther Proll¹ und Günter Gauglitz¹

¹Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland

²Institut für Mikrotechnik, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Deutschland

³Institut für Informatik, Universität Oldenburg, Oldenburg, Deutschland

Kontakt: monika.conrad@uni-tuebingen.de

Einleitung

Schnelle Untersuchungen direkt vor Ort (Point-of-Care Testing, POCT) erlangen immer größere Relevanz [1]. Der große Vorteil von POCT gegenüber herkömmlichen Methoden liegt darin, dass das Versenden der Proben ins Labor entfällt, was eine Zeit- und Kostenersparnis bedeutet. Damit erlangen vor allem Menschen in Entwicklungsländern eine bessere medizinische Versorgung und in Industrieländern wie Deutschland erhalten Ärzte und ihre Patienten u.a. neue Möglichkeiten der Medikamentenüberwachung. POCT eröffnet z.B. bei der Behandlung mit Psychopharmaka eine besser auf den Patienten abgestimmte Therapie, da schnell überprüft werden kann, ob bei Medikamenten mit enger therapeutischer Breite die richtige Dosis gegeben wird. Dies führt zu einer deutlichen Verbesserung der Situation der Patienten.

Damit ein Testverfahren für POCT geeignet ist, muss es kosteneffizient und leicht zu handhaben sein sowie schnell Ergebnisse liefern. Da Lateral Flow Tests (LFT) diese Anforderungen erfüllen, sind sie hervorragend dafür geeignet. Ein LFT setzt sich üblicherweise aus mehreren Komponenten zusammen: Sample Pad, Konjugat Pad, Membran mit Test- und Kontrolllinie und Absorbent Pad [2].

Auf das Sample Pad wird die Probe aufgegeben, seine Aufgabe ist es, die Probe aufzunehmen und die Probe kontrolliert an das Konjugat Pad abzugeben. Häufig wird es imprägniert, um die Viskosität, die Fließgeschwindigkeit und den pH-Wert anzupassen sowie unspezifische Wechselwirkungen zu eliminieren [3]. Auf das Konjugat-Pad werden die Erkennungselemente aufgebracht, welche durch den Probenfluss gelöst werden. Als Erkennungselemente dienen meist mit Goldnanopartikeln markierte

Antikörper, aber auch andere Markierungen wie Latex, Seilen, Kohlenstoff oder Liposome sind denkbar [4]. Der Vorteil von Goldnanopartikeln liegt darin, dass sie inert und stabil sind und eine intensive Farbe aufweisen, die nicht ausbleicht [5]. Nachdem die Probe das Konjugat Pad passiert hat, gelangt sie auf die Membran, wo sie zunächst auf die Testlinie trifft. Hier entsteht ein Farbsignal abhängig von der Analyt-Konzentration in der Probe. Nach der Testlinie trifft die Probe auf die Kontrolllinie, welche den erfolgreichen Fluss der Probe anzeigt. Am Ende des Teststreifens befindet sich das Absorbent Pad, welches die Probenflüssigkeit aufnimmt und so dazu beiträgt, den Fluss der Probe über die Membran aufrechtzuerhalten, und den Rückfluss der Probe verhindert.

Für die Empfindlichkeit eines LFTs hat das Erkennungselement eine herausragende Bedeutung [6]. Zunächst muss ein Antikörper mit hoher Affinitätskonstante ausgewählt werden, wofür es verschiedene direkte optische Methoden gibt [7]. Der hier verwendete Antikörper weist eine Dissoziationskonstante von 54 nM auf [8]. Dieser Antikörper wird über verschiedenen Strategien mit Goldnanopartikeln markiert. Betrachtet werden die direkte Adsorption von unverändertem und reduziertem Antikörper, die kovalente Anbindung über einen Polyethylenglykol (PEG) Linker und die Anbindung über die Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung zwischen Streptavidin-Gold und biotinyliertem Antikörper (s. Abb. 1).

Bei der Funktionalisierung ist es wichtig, dass der Antikörper seine Funktionalität erhält und richtig orientiert ist. Die einfachste Methode Antikörper an Goldnanopartikel anzubinden ist die direkte Adsorption [9]. Bei der Direktbeschichtung bindet der Antikörper über nicht-kovalente

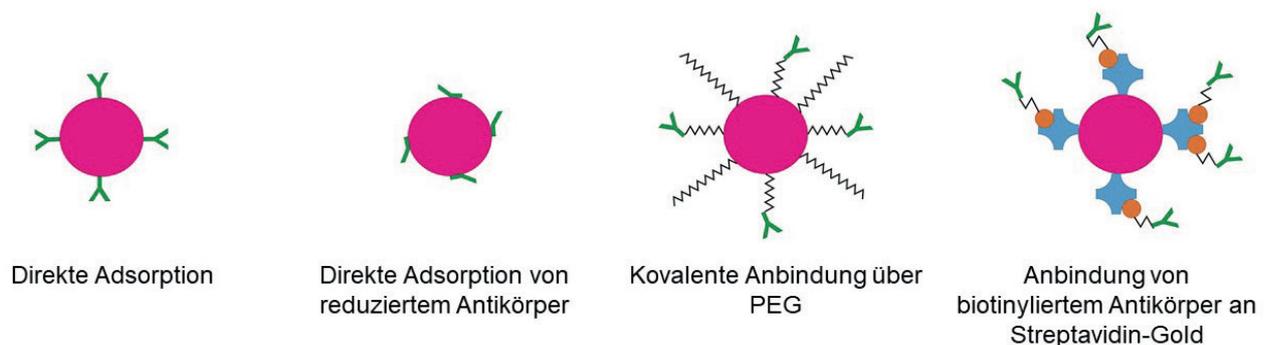


Abb. 1: Strategien zur Markierung von Antikörpern mit Goldnanopartikeln

Wechselwirkungen an die Goldoberfläche. Bei dieser Art der Anbindung ist die Orientierung des Antikörpers zufällig, sodass die Möglichkeit besteht, dass kein Paratop für die Bindung des Analyten zur Verfügung steht. Es wurde festgestellt, dass die Orientierung vom pH der Lösung abhängt und die besten Ergebnisse bei pH 7,5 erzielt werden können [10].

Eine Methode für eine orientierte Anbindung ist, den Antikörper zu reduzieren [11, 12]. Dabei werden Disulfidbrücken aufgebrochen und Thiolgruppen freigesetzt, welche an die Goldoberfläche binden. Durch die Reduktion werden die Antikörper in zwei Hälften geteilt, welche sich so auf der Goldoberfläche orientieren, dass das Paratop zugänglich ist. Besonders gut geeignet als Reduktionsmittel ist Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP), da es ein mildes Reduktionsmittel ohne Thiolgruppen ist, sodass es nach der Reduktion nicht entfernt werden muss.

Ein weiterer Ansatz zur Anbindung der Antikörper an Goldnanopartikel ist die Ausbildung einer kovalenten Bindung mit einem an die Goldoberfläche gebundenen Linker. Als Linker kann bifunktionelles PEG verwendet werden [13–15], welches über eine Thiolgruppe an die Goldoberfläche anbindet, während auf der anderen Molekülseite eine Carboxylgruppe über Carbodiimid-Chemie an Aminogruppen der Antikörper binden kann.

Die vierte Methode zur Konjugatsynthese, die hier betrachtet werden soll, ist die Nutzung der starken Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin [16]. Dabei wird der Antikörper biotinyliert und bindet an die mit Streptavidin beschichteten Goldnanopartikel.

Das Ziel dieser Untersuchungen ist, ein geeignetes Konjugat für den Nachweis kleiner Moleküle zu finden. Der quantitative Nachweis von kleinen Molekülen über LFTs stellt noch eine Herausforderung dar, da bei kleinen Molekülen der klassische Sandwich-Assay nicht angewandt werden kann. Deswegen müssen andere Testformate gewählt werden, bei denen das Signal negativ mit der Analytkonzentration korreliert ist. Als Beispiel für ein kleines Molekül wurde Amitriptylin (AMT) ausgewählt. AMT hat ein Molekulargewicht von 277 Da und zählt zur Klasse der trizyklischen Antidepressiva. Von der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP) liegt eine dringende Empfehlung zu therapeutischem Drug Monitoring (TDM) für AMT vor [17]. Bei TDM geht es darum, die Medikamentenkonzentration im Blut zu quantifizieren, um die Pharmakotherapie zu optimieren. Um eine bessere Reproduzierbarkeit im Vergleich zu herkömmlichen LFTs zu erreichen, wurden die Teststreifen strukturiert, sodass eine Probe in vier

parallelen Kanälen gleichzeitig untersucht werden kann (s. Abb. 2).

Methoden und Materialien

Herstellung der Konjugate

Alle Konjugatsynthesen wurden in Eppendorf Protein LoBind Reaktionsgefäßen durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von Sigma-Aldrich verwendet.

Direktbeschichtung mit unverändertem Antikörper (DP): 5 µl 1,2 mg ml⁻¹ anti-Amitriptylin-Antikörper (anti-AMT, Klon 202, monoklonal, Maus, Aviva Systems) wurden mit 1 ml 1 OD Goldnanopartikeln (AuNP) ($7 \cdot 10^{11}$ Partikel ml⁻¹, 20 nm Durchmesser von BBI solutions) 40 min bei RT und 300 rpm inkubiert. 100 µl 10 mg ml⁻¹ Rinderserumalbumin (RSA) in 10 mM PBS pH 7,4 wurden zugegeben und weitere 20 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Dazu wurde dreimal 30 min bei 8000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in 1 mg ml⁻¹ RSA-Lösung resuspendiert. Beim letzten Mal wurde mit 0,1 mg ml⁻¹ RSA auf 1 ml aufgefüllt und es wurden 100 mg Saccharose (Fluka) zugegeben.

Direktbeschichtung mit reduziertem Antikörper (DR): 4,2 µl anti-AMT und 5 µl 5 mM TCEP wurden in 40 µl 0,01 M PBS pH 6,8 bei RT und 300 rpm inkubiert. Nach 1 h wurde 1 ml AuNP zugegeben und 2 h weiter inkubiert. Anschließend wurde die Lösung wie oben gewaschen. Nach Abnahme des Überstandes wurde in 15 mg ml⁻¹ RSA in 10 mM PBS pH 6,8 resuspendiert. Beim letzten Mal wurde mit 0,1 mg ml⁻¹ RSA in PBS pH 7,4 auf 1 ml aufgefüllt und es wurden 100 mg Saccharose zugegeben.

Kovalente Anbindung über PEG-Linker (PE): 2,4 µl 1 mg ml⁻¹ SH-PEG(8)-COOH (459 Da, Iris Biotech) und 1,6 µl 10 mg ml⁻¹ SH-PEG-COOH (3000 Da, Rapp Polymere) wurden mit 1 ml AuNP OD 1 über Nacht bei RT und 650 rpm inkubiert. Um überschüssiges PEG zu entfernen, wurde dreimal 20 min bei 13000 g zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes in Wasser resuspendiert. Das letzte Mal wurden zum Sediment 2 µl 10 mg ml⁻¹ 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 3,6 µl 10 mg ml⁻¹ N-Hydroxysulfosuccinimid (sulfo-NHS) in 10 mM MES pH 5 gegeben und 10 min bei 37 °C und 650 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl MES wurde die Lösung bei 13000 g 10 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden zum Rückstand 16 µl 1,2 mg ml⁻¹ anti-AMT und 400 µl MES gegeben und über Nacht bei RT und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde 30 min bei 8000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde in Hydrogencarbonat-Puffer pH 8,0 resuspendiert und 30 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde in 20 mg ml⁻¹ RSA in 10 mM MES pH 6 resuspendiert und 1 h bei RT und 300 rpm inkubiert. Abschließend wurden zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit PBS pH 7,4 auf 1 ml aufgefüllt und 100 mg Saccharose zugegeben.

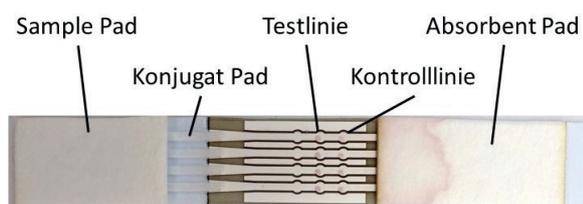


Abb. 2: Teststreifen mit parallelen Kanälen

Biotinylierter Antikörper an Streptavidin-Gold (SB): 5 μl 1,2 mg ml^{-1} anti-AMT wurden mit 0,47 μl 1 mg ml^{-1} NHS-PEG4-Biotin (Thermo Scientific) in 50 μl PBS 1 h bei RT inkubiert. Um überschüssiges Biotinylierungsreagenz zu entfernen, wurden 400 μl PBS zugegeben und mit Zentrifugenfiltern (Amicon Ultra 30 K) dreimal 20 min bei 8000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Rückstand wurde zu 1 ml OD 1 Streptavidin-Gold (SAuNP, microcoat, AuNP-Durchmesser 40 nm) gegeben und 1 h bei RT und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Lösung wie oben gewaschen und dabei mit 1 mg ml^{-1} RSA in TRIS pH 7,4 resuspendiert. Beim letzten Mal wurde mit 0,1 mg ml^{-1} RSA auf 1 ml aufgefüllt und es wurden 100 mg Saccharose zugegeben.

UV-Vis-Spektroskopie

UV-Vis-Spektren wurden in 1 cm Quartz-Küvetten mit einem Lambda 9 Spektrometer aufgenommen. Die Referenzküvette wurde mit PBS gefüllt und die Spektren von 450 – 700 nm bei einer spektralen Auflösung von 1 nm aufgenommen.

Dynamische Lichtstreuung

DLS-Messungen wurden mit einem Zetasizer Nano ZS von Malvern Panalytical mit 50 μl Probe in Einweg-Mikroküvetten unter einem Winkel von 173 ° bei 25 °C durchgeführt. Die Wellenlänge des HeNe-Lasers war 633 nm. Jede Probe wurde dreifach bestimmt und ein Durchschnittsergebnis gebildet. Der verwendete Brechungsindex für die Partikel war 0,135 und als Probenviskosität wurde die Viskosität von Wasser 0,8872 und der Brechungsindex 1,330 angenommen.

Membranstrukturierung

Nitrocellusemembranen (CN-140 UniSart, Sartorius) wurden mit Kalt-Laserablation strukturiert [18]. Ein Yb:KGW-Festkörperlaser (Light Conversion Pharos, Vilnius, Litauen) mit einer Wellenlänge von 1030 nm wurde zur Strukturierung verwendet. Dieser Laser wurde mit einer Pulsfrequenz von 600 kHz, einer Laserleistung von 6,74 W und einer Schreibgeschwindigkeit von 2400 mm s^{-1} auf die Nitrocellusemembran fokussiert. Eine hohe Photonendichte wurde mit ultrakurzen Laserpulsen von 212 fs auf einen 19 μm großen Spot fokussiert. Auf diese Weise wurden Kanalbarrieren im Abstand von 1000 μm strukturiert, wodurch vier Kanäle entstanden. Auch Konvexitäten wurden wie beschrieben realisiert.

Aufbau Teststreifen

Für die Sample Pads wurden Cellulosestreifen (Merck Millipore) 4 h in 0,5 % RSA und 0,25 % Tween® 20 in 100 mM TRIS pH 8 unter leichtem Schütteln imprägniert und anschließend bei RT über Nacht getrocknet. Mit dem Laser strukturierte Glasfaserstreifen wurden zur Verwendung als Konjugat Pad in 10 mg ml^{-1} RSA in PBS pH 7,4 1 h imprägniert und über Nacht bei RT getrocknet. Auf den Stegen der Pads wurden zweimal 2,18 μl DR-Konjugat-Lösung (OD 0,92) aufgebracht und 1 h bei 37 °C getrocknet. Die Test- und Kontrolllinie wurden auf die Teststreifen

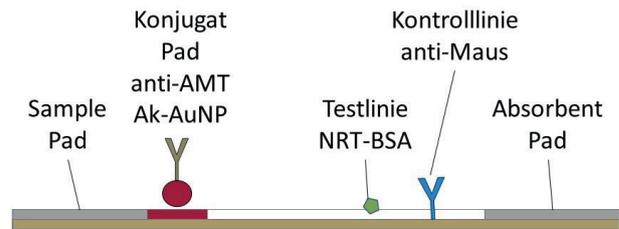


Abb. 3: Schematischer Aufbau der verwendeten Teststreifen

mittels eines kontaktlos-Spotters von M2-Automation aufgebracht. Dazu wurden zweimal 45 nl einer 1 mg ml^{-1} Lösung mit einer Pulsdauer von 950 μs gespottet. Für die Testlinie wurde Nortriptylin-RSA-Konjugat (CalBioagents) und für die Kontrolllinie anti-Maus (polyklonal, Ziege, Bio-Rad) verwendet. Als Absorbent Pad wurden die gleichen Cellulosestreifen wie für die Sample Pads ohne Imprägnierung verwendet.

Um den Teststreifen aufzubauen, wurde die Nitrocellusemembran auf eine Plastikkarte aufgeklebt. Auf der einen Seite wurde das strukturierte Konjugat-Pad und das Sample Pad aufgeklebt, auf der anderen Seite das Absorbent Pad (s. Abb. 3). Dabei überlappten die einzelnen Bestandteile 1 mm. Um den Test zu starten, wurde Probenflüssigkeit auf das Sample Pad aufgetragen. Die Probe floss über das Konjugat Pad, wo sie die mit Goldnanopartikeln markierten Antikörper löste, und durch Kapillarkräfte durch die Nitrocellusemembran bis zum Absorbent Pad transportiert wurde, welches überschüssige Probenflüssigkeit aufnahm. Auf der Testlinie befand sich das immobilisierte NRT-RSA-Konjugat, an welches freie anti-AMT-Goldnanopartikel banden. Nach der Testlinie passierte die Probe die Kontrolllinie, auf welcher anti-Maus nicht bereits an der Testlinie gebundene anti-AMT-Goldnanopartikel fingen und so den erfolgreichen Fluss anzeigten.

Kalibrierung

Für die Aufnahme einer Kalibrierung wurden auf acht strukturierte Teststreifen 250 μl Probenlösung mit verschiedenen AMT-Konzentrationen (0, 1, 10, 30, 100, 300, 1000, 10000 $\mu\text{g l}^{-1}$) in PBS pH 7,4 aufgebracht und im trockenen Zustand einzeln fotografiert (Kompaktkamera RX100III, Sony).

Auswertung

Die Farbspots auf den Teststreifen wurden mit einer eigens entwickelten Software, die auf Deep Learning basiert, ausgewertet. Diese verwendet die mit dem Laser aufbrachten Strukturen, um die Testzonen im Foto zu finden und alle Testzonen zu lokalisieren. Da die Sensitivität gegenüber der Rotfärbung im grünen Farbkanal am größten ist, wird für die Auswertung nur der grüne Kanal verwendet. Anhand mehrerer Referenzpunkte auf dem Sensor können lokale und globale Beleuchtungsvariationen korrigiert werden. Um nur die Pixel auszuwerten, in denen der rote Farbumschlag stattgefunden hat, wird eine Segmentierung durchgeführt, die auf der Otsu Schwellwert-Methode

basiert [19]. Die Intensität wird als Differenz der mittleren Intensität des roten Spots und einer Referenzzone direkt davor berechnet. Anschließend wird der Quotient aus Intensität der Testlinie und der Kontrolllinie gebildet und der Mittelwert und die Standardabweichung der Signale der vier Kanäle eines Teststreifens berechnet. Die Signale wurden auf das Signal der Nullkonzentration normiert. Zur Ermittlung einer Kalibrierfunktion wurde eine logistische Funktion mit Origin 2021 an die Werte angepasst. Die Nachweisgrenze (LOD) wurde als Schnittpunkt der unteren Grenze des 95 % Konfidenzbandes mit der Kalibrierkurve und die Bestimmungsgrenze (LOQ) als Schnittpunkt mit der oberen Grenze des Konfidenzbandes bestimmt.

Ergebnisse

Dynamische Lichtstreuung

DLS-Messungen erlauben die Bestimmung der Größe von Partikeln in kolloidalen Lösungen. Dabei wird der hydrodynamische Durchmesser bestimmt. Die Partikel-

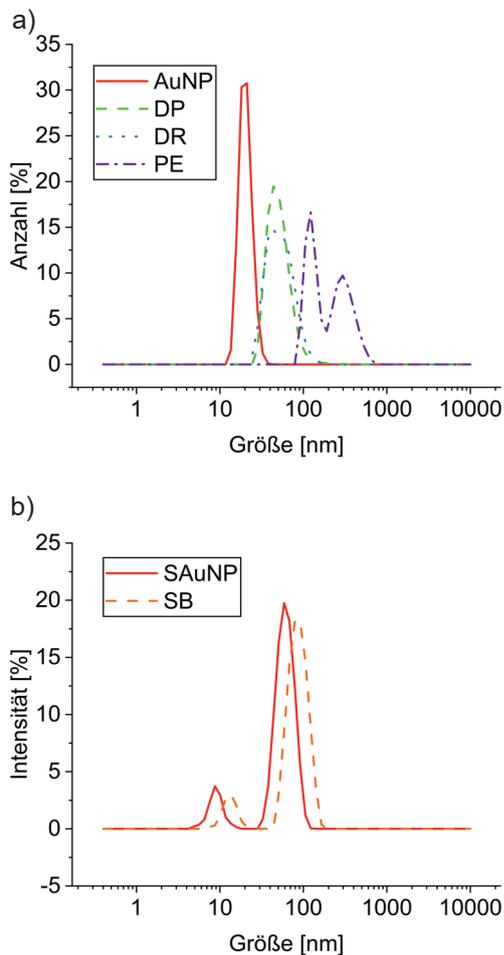


Abb. 5: Größenverteilung der Konjugate mit DLS bestimmt, a) zahlenmäßige Verteilung des hydrodynamischen Durchmessers der Konjugate DP, DR und PE im Vergleich zum Edukt Goldnanopartikeln mit 20 nm Durchmesser, b) Intensitätsverteilung des hydrodynamischen Durchmessers des Konjugats SB im Vergleich zum Edukt Streptavidin-Gold (SAuNP)

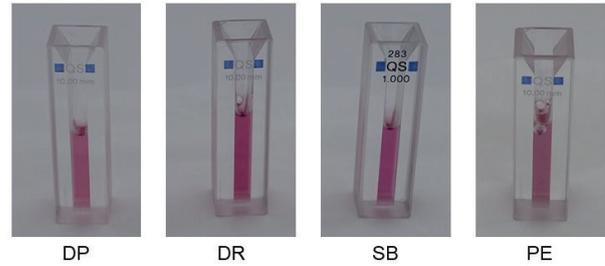


Abb. 4: Konjugate DP, DR, SB und PE fotografiert in Küvetten

größe der hergestellten Konjugate und der Edukte (AuNP und SAuNP) wurde bestimmt (s. Abb. 5). Dabei wird deutlich, dass die verwendeten AuNP mit einem laut Hersteller 20 nm Durchmesser, einen hydrodynamischen Durchmesser (Z-Average) von $(22,73 \pm 0,16)$ nm haben s. Abb. 5a. Die Verteilung der daraus hergestellten Konjugate DR, DP und PE zeigt, dass der Durchmesser durch die Beschichtung zunimmt und im Fall von DR und DP zu einer leichten Verbreiterung des Peaks führt. Bei PE sind zwei Peaks bei größeren Durchmessern zu sehen. Beim Vergleich der Größenverteilung von SB-Konjugat zu seinem Edukt SAuNP zeigt sich eine ähnliche Verteilung mit zwei Peaks zu größeren Durchmessern verschoben s. Abb. 5b.

UV-Vis-Spektroskopie

Die hergestellten Konjugate wurden nach der Synthese in Küvetten fotografiert s. Abb. 4. Darauf ist direkt zu erkennen, dass alle Konjugate eine intensiv rote Farbe aufweisen, wobei das Konjugat DR die höchste Farbintensität zeigt, während die Intensität von DP und PE geringer ausfällt. Da alle Synthesen mit 1 ml Goldnanopartikel-Lösung gestartet und am Ende auf das gleiche Volumen gebracht wurden, kann aus der Farbintensität auf die Verluste während der Synthesen geschlossen werden. DR weist die geringsten Verluste auf.

Daher wurde für das Konjugat DR und sein Edukt AuNP ein UV-Vis-Spektrum aufgenommen s. Abb. 6. Das Spektrum von AuNP zeigt ein Maximum bei der Wellenlänge λ_{\max} 522 nm und eine optische Dichte von 1,0 wie vom Hersteller angegeben. Nach der Beschichtung mit

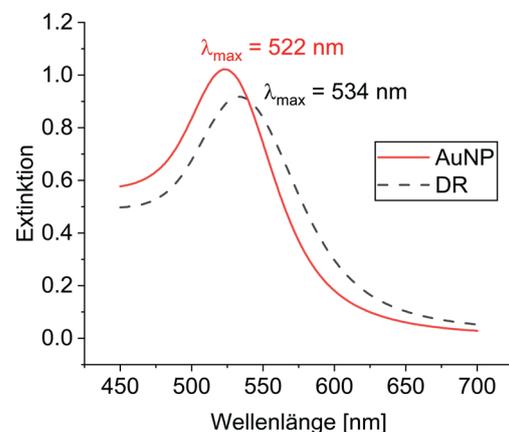


Abb. 6: UV-Vis-Spektren von Konjugat DR und AuNP

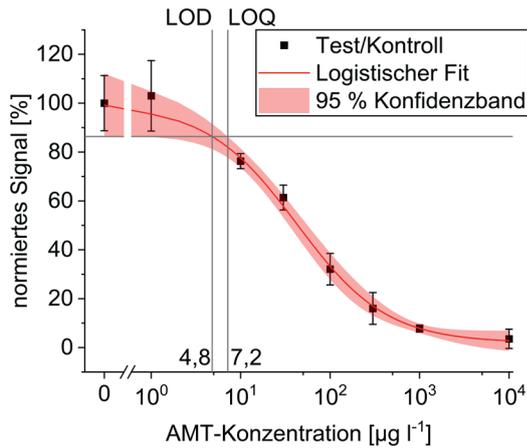


Abb. 7: Kalibrierung für Konjugat DR: Es wurde das normierte Signal (Quotient aus Intensität der Testlinie und Intensität der Kontrolllinie) als Funktion der AMT-Konzentration aufgetragen. Zur Erstellung einer Kalibrierkurve (rot) wurde eine logistische Funktion verwendet. Die Konfidenzbänder (95 %, hellrot), LOD und LOQ (grau) sind eingezeichnet.

reduziertem Antikörper verschiebt sich das Maximum wie erwartet zu höheren Wellenlängen, hier zu 534 nm, und einer optischen Dichte von 0,9.

Kalibrierung

Das Konjugat DR wurde auf seine Funktionsweise auf den Teststreifen untersucht. Dafür wurde eine Kalibrierung mit acht verschiedenen AMT-Konzentrationen aufgenommen s. Abb. 7. Die Kalibrierkurve folgt einer logistischen Funktion, die erfolgreich angepasst wurde s. Tab. 1. Anhand des Konfidenzbandes wurden LOD und LOQ bestimmt. Die LOD liegt bei $4,8 \mu\text{g l}^{-1}$ und die LOQ bei $7,2 \mu\text{g l}^{-1}$.

Tab. 1: Formel für den logistischen Fit und die Werte mit Standardfehlern der angepassten Funktion

Formel	$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$	
Parameter	Wert	Standardfehler
A_1	99	5
A_2	1,9	1,9
x_0	42	6
p	0,87	0,09

Diskussion

Dynamische Lichtstreuung

Die DLS-Messungen (s. Abb. 5) zeigen, dass die AuNP mit einem Durchmesser von 20 nm eine schmale Größenverteilung aufweisen. Durch die Beschichtung kommt es zu einer Vergrößerung des Durchmessers, was ein Hinweis auf eine erfolgreiche Anbindung des Antikörpers an die Goldoberfläche ist. Gleichzeitig verbreitern sich die Peaks

bei DP und DR etwas, was durch unterschiedliche Anlagerung des Antikörpers verursacht oder ein Hinweis auf geringe Agglomeration sein kann. Für PE zeigt die DLS-Messung zwei Peaks bei größeren Durchmessern und damit die Agglomeration der Partikel. Bei dieser Synthese wurden mit Carbodiimid-Chemie Bindungen zwischen der Carboxylgruppe des PEG und Aminogruppen des Antikörpers gebildet. Wenn EDC/sulfo-NHS durch die Zentrifugation nicht vollständig entfernt wurde, ist es möglich, dass Carboxylgruppen der Antikörper aktiviert wurden und anschließend mit Aminogruppen anderer Antikörper reagierten und hier kovalente Bindungen knüpften, die sich als Agglomerate zeigen.

In der Größenverteilung von SAuNP und SB sind zwei Peaks zu sehen. Der kleinere lässt sich vermutlich RSA zuzuordnen, welches zur Absättigung zugegeben wurde, während der Peak beim größeren Durchmesser für SAuNP den 40 nm großen Goldpartikeln mit Streptavidin-Beschichtung entspricht. Durch die Anbindung des biotinylierten Antikörpers an die Partikel vergrößert sich der Durchmesser, ohne dass es zu einer Peakverbreiterung kommt. Hier ist davon auszugehen, dass die Partikel kaum agglomerieren.

Aus den DLS-Messungen lässt sich schließen, dass vor allem die Anbindung des Antikörpers über einen PEG-Linker zu Agglomeration führen kann. Somit ist die PE-Synthese in dieser Hinsicht am wenigsten geeignet.

UV-Vis-Spektroskopie

Die Fotos der Konjugat-Lösungen (s. Abb. 4) zeigen eine rote Farbe für alle Konjugate. Das deutet daraufhin, dass keine Flokkulation aufgetreten ist und bei allen Konjugaten eine erfolgreiche Beschichtung und Stabilisierung der Goldnanopartikel stattfindet. Die höchste Farbintensität zeigt das Konjugat DR, damit weist dieses Konjugat die höchste Ausbeute auf. Die geringere Ausbeute des PE-Konjugats lässt sich mit der stärkeren Agglomeration erklären. Weitere Verluste lassen sich auf die unterschiedliche Stabilisierung der Konjugate durch die jeweilige Beschichtung und unterschiedliche starke Adsorption an die Wände der Reaktionsgefäße zurückführen. Außerdem kann es bei jedem Schritt des Überstands abnehmen dazu kommen, dass versehentlich auch die Nanopartikel entnommen wurden. Insgesamt wurde bei DR die höchste Ausbeute erreicht. Daher scheint diese Synthese die beste zu sein.

Das UV-Vis-Spektrum des DR-Konjugats zeigt die erwartete Verschiebung zu höheren Wellenlängen. Die starke Absorption von Goldnanopartikeln ist mit der Oberflächenplasmonenresonanz zu erklären, welche sich mit der Partikelgröße ändert. Bei größeren Partikelgrößen verschiebt sich das Maximum der Absorption zu größeren Wellenlängen. Außerdem lässt sich aus der Änderung der Extinktion des Maximums erkennen, dass eine Ausbeute von 90 % erreicht wurde. Da es zu keiner Peakverbreiterung durch die Synthese kommt, spielt Agglomeration eine vernachlässigbare Rolle.

Kalibrierung

Eine Kalibrierung auf den Teststreifen konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die erreichte LOD von $4,8 \mu\text{g l}^{-1}$ liegt eine Größenordnung höher als mit einem markierungsfreien Immunoassay mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie ($0,3 \mu\text{g l}^{-1}$) [20] erreicht wurde, ist aber ausreichend, um AMT in Patientenproben nach einer zehnfachen Verdünnung der Plasmaproben zu quantifizieren. Die wirksame Plasmakonzentration liegt bei $50 - 139 \mu\text{g l}^{-1}$ [21].

Fazit

Es wurde gezeigt, dass die Anbindung von anti-AMT an Goldnanopartikel nach Reduktion der Antikörper mit TCEP und anschließender direkter Anbindung der durch Reduktion erhaltenen Antikörperhälften an die Goldoberfläche über die freigesetzten Thiolgruppen besser geeignet ist als andere Methoden. Der Vorteil dieser Synthese liegt darin, dass sie einfach, schnell, mit großer Ausbeute und guter Stabilisierung der Goldnanopartikel erfolgt. Mit diesem Konjugat wurde erfolgreich eine Kalibrierung auf Teststreifen aufgenommen und ein Arbeitsbereich erreicht, indem Amitriptylin in realen Patientenproben quantifiziert werden kann.

Literatur

- [1] GOBLE, J.A.; ROCAFORT, P.T.: Point-of-Care Testing. In: *Pharm Pract* 30 (2017) Nr. 2, S. 229–237.
- [2] KOCZULA, K.M.; GALLOTTA, A.: Lateral flow assays. In: *Essays Biochem* 60 (2016) Nr. 1, S. 111–120.
- [3] MERCK MILLIPORE: *Rapid Lateral Flow Test Strips. Considerations for Product Development*. Darmstadt, Germany, 2013.
- [4] POSTHUMA-TRUMPIE, G.A.; KORF, J.; VAN AMERONGEN, A.: Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. In: *Anal Bioanal Chem* 393 (2009) Nr. 2, S. 569–582.
- [5] ASLAN, K. et al.: Angular-ratiometric plasmon-resonance based light scattering for bioaffinity sensing. In: *J Am Chem Soc* 127 (2005) Nr. 34, S. 12115–12121.
- [6] MORALES, M.A.; HALPERN, J.M.: Guide to Selecting a Bio-recognition Element for Biosensors. In: *Bioconjugate Chem* 29 (2018) Nr. 10, S. 3231–3239.
- [7] GAUGLITZ, G.: Critical assessment of relevant methods in the field of biosensors with direct optical detection based on fibers and waveguides using plasmonic, resonance, and interference effects. In: *Anal Bioanal Chem* 412 (2020) Nr. 14, S. 3317–3349.
- [8] CONRAD, M. et al.: Comparison of methods for quantitative biomolecular interaction analysis. In: *Anal Bioanal Chem* (2021).
- [9] GEOGHEGAN, W.D.; ACKERMAN, G.A.: Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application. In: *J Histochem Cytochem* 25 (1977) Nr. 11, S. 1187–1200.
- [10] RUIZ, G. et al.: pH Impacts the Orientation of Antibody Adsorbed onto Gold Nanoparticles. In: *Bioconjugate Chem* 30 (2019) Nr. 4, S. 1182–1191.
- [11] MAKARAVICIUTE, A. et al.: Considerations in producing preferentially reduced half-antibody fragments. In: *J Immunol Methods* 429 (2016), S. 50–56.
- [12] SHARMA, H.; MUTHARASAN, R.: Half antibody fragments improve biosensor sensitivity without loss of selectivity. In: *Anal Chem* 85 (2013) Nr. 4, S. 2472–2477.
- [13] ECK, W. et al.: PEGylated gold nanoparticles conjugated to monoclonal F19 antibodies as targeted labeling agents for human pancreatic carcinoma tissue. In: *ACS Nano* 2 (2008) Nr. 11, S. 2263–2272.
- [14] LIU, T.; THIERRY, B.: A solution to the PEG dilemma: efficient bioconjugation of large gold nanoparticles for biodiagnostic applications using mixed layers. In: *Langmuir* 28 (2012) Nr. 44, S. 15634–15642.
- [15] PAROLO, C. et al.: Design, preparation, and evaluation of a fixed-orientation antibody/gold-nanoparticle conjugate as an immunosensing label. In: *ACS Appl Mater Interfaces* 5 (2013) Nr. 21, S. 10753–10759.
- [16] WEBER, P.C. et al.: Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. In: *Science* 243 (1989) Nr. 4887, S. 85–88.
- [17] HIEMKE, C. et al.: Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. In: *Pharmacopsychiatry* 51 (2018) 1-02, S. 9–62.
- [18] HECHT, L.; VAN ROSSUM, D.; DIETZEL, A.: Femtosecond-laser-structured nitrocellulose membranes for multi-parameter Point-of-Care tests. In: *Microelectron Eng* 158 (2016), S. 52–58.
- [19] OTSU, N.: A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. In: *IEEE Trans Syst Man Cybern Syst* 9 (1979) Nr. 1, S. 62–66.
- [20] KRIEG, A.K.; GAUGLITZ, G.: Ultrasensitive label-free immunoassay for optical determination of amitriptyline and related tricyclic antidepressants in human serum. In: *Anal Chem* 87 (2015) Nr. 17, S. 8845–8850.
- [21] ASBERG, M. et al.: Relationship between plasma level and therapeutic effect of nortriptyline. In: *British medical journal* 3 (1971) Nr. 5770, S. 331–334.

Danksagung

Wir danken microcoat für die Bereitstellung von Streptavidin-Gold und Lilian Labs für die Möglichkeit, den kontaktlosen Spotter zu nutzen.

Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie im Rahmen des Projektes „On-Chip kalibrierender Biosensor für kleine Analyten im Bereich POCT und Umweltanalytik“, IGF-Vorhaben-Nr. 20949 N/2 finanziert.