Entwicklung biologischer Schichten für die Blutanalytik mit Schwingquarzsensoren

Jan Claußen

Vom Fachbereich Physik der Technischen Universität Kaiserslautern zur
Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation

durchgeführt am Institut für Klinische und Experimentelle
Transfusionsmedizin in Tübingen (IKET)

unter Anleitung von

Prof. Dr. Ch. Ziegler
Fachbereich Physik der Technischen Universität
Kaiserslautern

Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Northoff (IKET)

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 03.11.2006

Diese Dissertation entstand während meiner Tätigkeit vom 1.10.2003-30.09.2006 innerhalb der Biosensorik-Gruppe (AG Gehring) des Instituts für Experimentelle und Klinische Transfusionsmedizin unter der Anleitung von Dr. rer. nat. Frank K. Gehring. Die Begutachtung wurde von Prof. Dr. Northoff, Universität Tübingen und Prof. Dr. Ch. Ziegler, Technische Universität Kaiserslautern übernommen.

Berichte aus der Biotechnologie

Jan Claußen

**Entwicklung biologischer Schichten für
die Blutanalytik mit Schwingquarzsensoren**

D 386 (Diss. Technische Universität Kaiserslautern)

Shaker Verlag
Aachen 2007

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Kaiserslautern, TU, Diss., 2006

Copyright Shaker Verlag 2007

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-5861-0

ISSN 1434-4556

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407/95 96 - 0 • Telefax: 02407/95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

ENTWICKLUNG BIOLOGISCHER SCHICHTEN FÜR DIE BLUTANALYTIK MIT SCHWINGQUARZSENSOREN

KURZFASSUNG

Zur Analyse von Adsorptions- und Grenzschichtphänomenen gewinnen akustische Sensoren zunehmend an Bedeutung. In der Dissertation wurden Schwingquarze mit einer Resonanzfrequenz von 10 MHz als akustische Sensoren verwendet. Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Entwicklung eines Nachweises von Blutgruppenantigenen und Antikörpern mit Schwingquarzsensoren und die Entwicklung eines Lab-on-a-Chip-Systems für die Blutanalytik.

Ausgehend von der Bestimmung der Parameter wie Zusammensetzung, Polarität und Rauheit der Sensoroberfläche durch Rasterkraftmikroskopie-, Rasterelektronenmikroskopie-, Röntgenphotoelektronenspektroskopie- und Kontaktwinkelmessungen wurden biologische Schichten für die Blutanalytik mit Schwingquarzsensoren entwickelt. Die Entwicklung der biologischen Schichten unterteilte sich in vier Schritte: (I) Entwicklung von Techniken zur Immobilisierung von Protein A und Ghosts (Erythrozytenmembranen), (II) Optimierung der Blutgruppenserologie zur spezifischen Immobilisierung von Erythrozyten, (III) Adaption und Optimierung der sensitiven Schichten an die physikalischen Randbedingungen des Sensorsystems für den Blutgruppennachweis in verdünntem Vollblut und (IV) Einsatz der biologischen Schichten zur Blutgruppenbestimmung in einem vollautomatischen Blutanalysegerät. Mit den entwickelten biologischen Schichten konnten die Antigene A und B des ABO-Systems, das Antigen D des Rhesussystems und K des Kellsystems von Erythrozyten in verdünntem Vollblut mit Schwingquarzsensoren nachgewiesen werden. Aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen von Proteinen aus dem Plasma mit der Sensoroberfläche konnte die spezifische Ankopplung von Antikörpern wie die der Isoagglutinine an mit Antigenen beschichteten QCM-Sensoren nicht direkt nachgewiesen werden. Jedoch konnte der Nachweis indirekt erfolgen, indem die nachzuweisenden Antikörper zuerst spezifisch an die Antigene von Erythrozyten immobilisiert und anschließend die beschichteten Erythrozyten mit einem QCM-Sensor nachgewiesen wurden.

Parallel zur Entwicklung der biologischen Schichten für die Blutanalytik mit Schwingquarzsensoren wurde innerhalb der Dissertation ein Lab-on-a-Chip-System für die massensensitive Blutgruppenanalytik mit Schwingquarzen entwickelt. Das zentrale Element der Plattform ist ein mikrofluidischer Chip, in dem ein Schwingquarzsensormikromischer und ein Sheath-Flow integriert

wurden. Am Beispiel der Bestimmung der Blutgruppe A des AB0-Systems von Erythrozyten in verdünntem Vollblut wurde gezeigt, dass der in die Mikrofluidik integrierte Schwingquarzsensoren zur Bioanalytik in komplexen biologischen Matrizes eingesetzt werden kann. Der gesamte mikrofluidische Chip ist optisch zugänglich, so dass in zukünftigen Systemen eine zusätzliche Integration optischer Methoden möglich wäre.

SUMMARY

There has been a significant increase in the interest in sensors, such as acoustic wave sensors, analysing adsorption and interface phenomena. In this dissertation a Quartz Crystal Microbalance (QCM) sensor with a resonance frequency of 10 MHz was used as an acoustic wave sensor. The purpose of the research was to detect antigens of red blood cells and antibodies of the blood plasma and to build up a lab-on-a-chip-system based on the QCM technique.

Firstly, parameters like the composition, polarity and roughness of the sensor surface were investigated by Scanning Force Microscopy, X-Ray Photoelectron Spectroscopy and contact angle measurements. Afterwards, biological layers were established on the sensor surface detecting blood groups and antibodies. Biological layer development was divided into four steps: (I) Development of techniques for immobilisation of specific antibodies, (II) improvement of the blood group serology coupling red blood cells specifically to the sensor surface, (III) adaptation and optimisation of the biological layers with respect to the physical behaviour of the sensor system and (IV) application of the biological layers in a fully automated blood typing system. The antigens A and B of the AB0 system, antigen D of the Rhesus system and antigen K of the Kell system of red blood cells were detected by the QCM sensor covered with biological layers composed of protein A and ghosts, respectively, and specific blood group antibodies. Due to non-specific interaction of proteins, coupling of antibodies like isoagglutinins from plasma to immobilized antigens on the sensor surface could not be detected with sufficient precision. They could however be determined indirectly by coupling them specifically to red blood cells and subsequently detecting the coated cells with a QCM sensor.

The lab-on-a-chip system is based on the integration of a QCM sensor, a micro mixer and a sheath flow into a micro fluidic chip detecting antigens on the membrane of red blood cells. This study has shown that the developed system could be applied in a complex biological matrix, such as human blood. Due to the fact that the whole micro fluidic chip is transparent, an integration of optical methods could be achieved in future applications.

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT **4**

2 THEORIE **7**

2.1 TRANSDUKTIONSMECHANISMEN VON BIOSENSOREN **7**

2.2 MODELLE ZUR BESCHREIBUNG VOM SCHWINGQUARZSENSOREN **14**

2.2.1 PIEZOELEKTRISCHER EFFEKT 14

2.2.2 MODELL NACH SAUERBREY ZUR BESCHREIBUNG RIGIDER DÜNNER SCHICHTEN 16

2.2.3 MODELL NACH KANAZAWA UND GORDON ZUR BESCHREIBUNG REIN VISKOSER SCHICHTEN 17

2.2.4 VERHALTEN DES SCHWINGQUARZSENSORS BEI VISKOELASTISCHEN SCHICHTEN 18

2.3 BLUT **24**

2.3.1 ANTIKÖRPER IM PLASMA 24

2.3.2 BLUTGRUPPENSYSTEME VON ERYTHROZYTEN 28

2.4 BIOLOGISCHE SCHICHTEN FÜR DIE ANALYTIK MIT SCHWINGQUARZSENSOREN **34**

2.4.1 IMMOBILISIERUNG VON ANTIKÖRPERN AN NICHT ADAPTIERTE BIOLOGISCHE SYSTEME 35

2.4.2 IMMOBILISIERUNG VON ANTIKÖRPERN AN ADAPTIERTE BIOLOGISCHE SYSTEME 37

2.4.3 BLUTGRUPPENANALYTIK MIT SCHWINGQUARZSENSOREN 41

3 EXPERIMENTELLER TEIL **43**

3.1 SCHICHTPRÄPARATION AUF DER SENSOROBERFLÄCHE **43**

3.1.1 OXIDATIVE AKTIVIERUNG DER SCHWINGQUARZELEKTRODE 43

3.1.2 PRÄPARATION VON GHOSTSCHICHTEN 43

3.1.3 PRÄPARATION VON PROTEIN A-SCHICHTEN 45

3.2 CHARAKTERISIERUNG DER SENSOROBERFLÄCHE UND DER BIOLOGISCHEN SCHICHTEN **47**

3.2.1 REM-AUFNAHMEN 47

3.2.2 SFM-MESSUNGEN 47

3.2.3 XPS-MESSUNGEN 47

3.2.4 KONTAKTWINKELMESSUNGEN 48

3.2.5 LICHTMIKROSKOPIE 48

3.3	QCM-MESSUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG BIOLOGISCHER SCHICHTEN	48
3.4	PROBENVORBEREITUNG HUMANER VOLLBLUTPROBEN UND ANDERER BLUTBESTANDTEILE	52
4	<u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u>	<u>54</u>
4.1	CHARAKTERISIERUNG DER OBERFLÄCHE VON SCHWINGQUARZ- ELEKTRODEN	54
4.1.1	TOPOGRAPHIE UND ZUSAMMENSETZUNG	54
4.1.2	CHARAKTERISIERUNG DER NASS- UND TROCKENCHEMISCHEN REINIGUNGSPROZESSE	58
4.2	ENTWICKLUNG VON GHOSTSCHICHTEN FÜR DIE BLUTGRUPPENANALYTIK MIT SCHWINGQUARZEN	62
4.2.1	IMMOBILISIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON GHOSTS AUF SCHWINGQUARZELEKTRODEN	64
4.2.2	OPTIMIERUNG DER SEROLOGISCHEN EIGENSCHAFTEN VON IMMOBILISIERTEN GHOSTS	73
4.2.3	OPTIMIERUNG DER MECHANISCHEN EIGENSCHAFTEN VON GHOSTSCHICHTEN ZUR ENTWICKLUNG EINES BLUTGRUPPENSSENSORS	81
4.2.4	GHOSTSCHICHTEN ZUM NACHWEIS DER ANTIGENE A, B UND D VON ERYTHROZYTEN	95
4.2.5	GHOSTSCHICHTEN ZUM NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN	114
4.3	PROTEIN A BESCHICHTETE GOLDELEKTRODEN FÜR DIE BLUTANALYTIK MIT SCHWINGQUARZEN	118
4.3.1	PROTEIN A-SCHICHTEN ZUR BESTIMMUNG DER BLUTGRUPPENANTIGENE A, K UND D VON ERYTHROZYTEN	118
4.3.2	PROTEIN A-SCHICHTEN ZUM NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN IM BLUTPLASMA	134
4.4	ENTWICKLUNG EINER MIKROFLUIDISCHEN PLATTFORM FÜR DIE BLUTGRUPPENANALYTIK MIT SCHWINGQUARZEN	147
4.4.1	SYSTEMKONZEPTION UND -ANFORDERUNGEN	148
4.4.2	INTEGRATION DES SCHWINGQUARZSENSORS IN DIE MIKROFLUIDIK	151
4.4.3	CHARAKTERISIERUNG DES MIKROFLUIDISCH INTEGRIERTEN SCHWINGQUARZSENSORS	157
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u>	<u>164</u>
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>168</u>