

Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik  
der Technischen Universität München

**Entwicklung von monoklonalen Antikörpern für  
Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) und deren Einsatz im  
konventionellen ELISA und in einem optischen Immunosensor**

**Cristina Mihaela Weber**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Wei-  
henstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

**Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Huber**

**Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. h. c. (RO)**

**A. Kettrup, em.**

**2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. P. M. Krämer**

**3. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. agr. habil.,**

**Dr. h. c. (Zonguldak Univ. / Türkei) H. Parlar**

Die Dissertation wurde am 27.12.2006 bei der Technischen Universität München einge-  
reicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,  
Landnutzung und Umwelt am 28.02.2007 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2003 bis Juli 2006 im Institut für Ökologische Chemie der GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg angefertigt.

### **BEDANKEN MÖCHTE ICH MICH...**

...sehr herzlich bei Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. Kettrup für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und Förderung

....sehr herzlich bei Herrn Dr. Schulte-Hostede für seine Unterstützung und für sein Interesse an der Arbeit

...sehr herzlich bei meiner Betreuerin Frau PD Dr. P. M. Krämer, die mich in allen Belangen dieser Arbeit intensiv unterstützt hat, für die hervorragende Zusammenarbeit, für das Durchsehen des Manuskripts

...sehr herzlich bei Frau Dr. E. Kremmer, IMI, GSF, für die Immunisierung der Ratten und für die angenehme und produktive Zusammenarbeit

...sehr herzlich bei Herrn Dr. P. Rauch, CANDOR Bioscience GmbH, Münster, für die Unterstützung und Beratung bei den Messungen mit dem optischen Immunosensor

...sehr herzlich bei allen AQUA-SCREEN-Projektpartnern und bei der Siemens AG, München, für die angenehme und produktive Zusammenarbeit

...sehr herzlich bei Herrn Dr. D. Martens für die hervorragende Zusammenarbeit und für die Messung der Sedimentproben mittels der Gaschromatographie

...sehr herzlich bei Herrn S. Forster für die Unterstützung und sehr gute kollegiale Zusammenarbeit

...sehr herzlich bei Frau B. Danzer für ihre intensive mentale Unterstützung, die sie mir während jeder Phase dieser Arbeit entgegenbrachte. Außerdem danke ich ihr für die Korrektur des Manuskripts

...sehr herzlich bei meinen Kollegen im IÖC für das freundliche Arbeitsklima und die Unterstützung sowie den kooperativen Stil

...und mein besonderer Dank gilt meinen Freunden, meinen Eltern und meinem Sohn Richard, die mich während dieser Arbeit immer unterstützt haben.

Der Europäischen Kommission danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit (EU-Projekt AQUA-SCREEN, Projektnummer: ICA4-CT-2002-10008).

# Inhaltsverzeichnis

I EINLEITUNG	1
1 DDT-Geschichte	1
2 Problemdarstellung	3
3 Metabolismus und Wirkungen des DDT	5
4 Antikörper	7
5 Immunoassays	10
6 Immunosensoren	14
7 Aufgabenstellung	17
8 Zusammenarbeit mit anderen Stellen	18
II MATERIAL UND METHODEN	19
1 Immunoassays	19
1.1 Allgemeine Materialien	19
1.2 Allgemeine Arbeitsgeräte	19
1.3 Allgemeine Immunoreagenzien	20
1.4 Herstellung der neuen Immunoreagenzien für DDT	21
1.4.1 Synthese der Hapten-Protein-Konjugate	22
1.4.2 Synthese der Enzym Tracer-Konjugate	23
1.4.3 Screening der Klone	24
1.5 Entwicklung eines konventionellen ELISAs	25
1.5.1 Coating Antigen-Format	27
1.5.1.1 Versuchsdurchführung	27
1.5.2 Enzym Tracer-Format	31
1.5.2.1 Versuchsdurchführung	31
1.6 Charakterisierung der Antikörper	33
1.6.1 Bestimmung von Kreuzreaktivitäten	33
1.6.2 Lösungsmittelverträglichkeit	33
1.7 Probennahme und Messung von Wasserproben	34
1.8 Probennahme und Messung von Sedimenten	34
1.9 Auswertung der Messdaten	35

2 Immunosensoren	36
2.1 Allgemeine Materialien und Arbeitsgeräte	36
2.2 Antikörper	36
2.3 Synthese der mAk DDT Oyster <sup>®</sup> -645-Konjugate	36
2.4 AQUA-OPTOSENSOR	38
2.5 Übertragung der Immunoreagenzien auf den Immunosensor	41
2.5.1 Versuchsaufbau mit AQUA-OPTOSENSOR	41
2.5.1.1 Optimierungen der Immunoreagenzien und Durchführung der Messungen	43
2.5.1.1.1 Messung von Realwasserproben	45
2.5.1.1.2 Messung von Sedimenten	45
3 Analyse mit Gaschromatographie und Massenspektrometer (GC/MS)	45
3.1 Materialien zur Probenaufbereitung	45
3.2 Allgemeine Geräte	46
3.3 Extraktion und Aufreinigung der Sedimentproben	47
III ERGEBNISSE UND DISKUSSION	49
1 Immunoassays	49
1.1 Herstellung der neuen Immunoreagenzien für DDT	49
1.1.1 Synthese und Charakterisierung der Hapten-Protein-Konjugate	49
1.1.2 Screening der Klone	51
1.1.3 Synthese der Hapten-Enzym-Konjugate	52
1.2 Entwicklung eines konventionellen ELISAs	53
1.2.1 Charakterisierung der Antikörper im Coating Antigen-Format	54
1.2.1.1 Einfluss der Lagertemperatur auf die Kompetition	54
1.2.1.2 Tests verschiedener Absättigungsreagenzien	55
1.2.1.3 Bestimmung von Kreuzreaktivitäten	57
1.2.1.3.1 Hapten-Protein-Konjugate mit reduziertem DDT-Hapten-Einsatz und Bestimmung von Kreuzreaktivitäten	59
1.2.2 Charakterisierung der Antikörper im Enzym Tracer-Format	62
1.2.2.1 Tests verschiedener Precoatings	62
1.2.2.2 Tests verschiedener Absättigungsreagenzien	64
1.2.2.3 Tests verschiedener Substrat-Konzentrationen	67
1.2.2.4 Bestimmung von Kreuzreaktivitäten im Enzym Tracer-Format	69

1.2.2.5 Lösungsmittelverträglichkeit	73
1.2.2.6 Auswirkung der Inkubationszeit auf den Standardansatz	79
2 AQUA-OPTOSENSOR	81
2.1 Analyse von <i>p,p'</i> -DDT und <i>o,p'</i> -DDT mit AQUA-OPTOSENSOR	81
2.2 Testversuche zum Nachweis von zwei Spots auf das Prisma	86
3 Analysen von Wasserproben mit ELISA und AQUA-OPTOSENSOR	87
3.1 Wasserproben aus München	87
3.2 Wasserproben vom Nairobi-Fluss	90
3.2.1 Tests in ELISA-Formaten	93
3.2.2 Tests mit AQUA-OPTOSENSOR-System	96
4 Analysen von Sedimenten	98
4.1 ELISA-Format und GC/MS	99
4.2 AQUA-OPTOSENSOR	104
IV ZUSAMMENFASSUNG	106
V AUSBLICK	109
VI LITERATURVERZEICHNIS	110
VII ANHANG	122
Teil A: Auflistung der allgemeinen Chemikalien und Lösungen	122
1 Immunoassay	122
2 Immunosensor	125
Teil B: Abbildungen und Tabellen	126
Teil C: Spektren	147
LEBENS LAUF	150

# Abbildungsverzeichnis:

<b>Abb. 1:</b> Verbreitung von DDT	4
<b>Abb. 2:</b> Struktur der beiden Isomere des DDT	6
<b>Abb. 3:</b> Metaboliten des DDT (DDE, DDD, DDA)	7
<b>Abb. 4:</b> Struktur eines Antikörpers	8
<b>Abb. 5:</b> Vergleich von direkt (links) und indirekt (rechts) kompetitivem ELISA	12
<b>Abb. 6:</b> Schematischer Aufbau eines Biosensors, hier: Immunosensor	14
<b>Abb. 7:</b> Schematische Darstellung der Entwicklungsschritte der benötigten Immunoreagenzien für DDT	21
<b>Abb. 8:</b> Struktur des DDT-Derivats Hapten	22
<b>Abb. 9:</b> Herstellung von neuen anti-DDT mAks	24
<b>Abb. 10:</b> Fluoreszenzfarbstoff-Oyster <sup>®</sup> -645-Denovo Biolabels GmbH, Münster, Deutschland	37
<b>Abb. 11:</b> AQUA-OPTOSENSOR	40
<b>Abb. 12:</b> Programmstart AQUA-OPTOSENSOR, version 1.00	42
<b>Abb. 13:</b> AQUA-OPTOSENSOR – Auswertung der Messungen	43
<b>Abb. 14:</b> Presse	44
<b>Abb. 15:</b> Darstellung des Analysenverfahrens zum Nachweis von DDT in Sedimentproben vom Nairobi-Fluss	48
<b>Abb. 16:</b> Vergleich von Standardkurven (OD [450-650 nm]) im Enzym Tracer-Format mit unterschiedlicher Hapten-Enzym-Konjugat-Konzentration	52
<b>Abb. 17:</b> Einfluss der Lagertemperatur	54
<b>Abb. 18:</b> Optimierte Standardkurven (% Control) im Coating Antigen-Format mit DDT-Hapten-OVA <sup>1/4</sup>	60
<b>Abb. 19:</b> 4-Parameter-Standardkurven – Einfluss verschiedener Absättigungsreagenzien und Konzentrationen auf die Assays	65-66
<b>Abb. 20:</b> 4-Parameter-Standardkurven – Einfluss verschiedener Substrat-Konzentrationen auf die Assays	68
<b>Abb. 21:</b> Optimierte Standardkurven (% Control) im Enzym Tracer-Format mit DDT-Hapten-HRP	71
<b>Abb. 22:</b> Optimierte Standardkurven (% Control) im Enzym Tracer-Format mit DDT-Hapten-GOD	72
<b>Abb. 23:</b> Lösungsmittelverträglichkeit im Enzym Tracer-Format-ELISA (mAk DDT 1C1)	74-76

<b>Abb. 24:</b> Lösungsmittelverträglichkeit im Enzym Tracer-Format-ELISA (mAk DDT 1C1, mAk DDT 7C12, mAk DDT 1B2)	77-78
<b>Abb. 25:</b> ELISA in Enzym Tracer-Format	80
<b>Abb. 26:</b> Standardkurven mit AQUA-OPTOSENSOR	83
<b>Abb. 27:</b> Messungen an verschiedenen Tagen (Standardkurven mit AQUA-OPTOSENSOR)	84
<b>Abb. 28:</b> AQUA-OPTOSENSOR mit mAk DDT 7C12-Oyster-645; zwei Peaks auf einem Sensor-Chip	86
<b>Abb. 29:</b> Karte der Nairobi-Provinz	91
<b>Abb. 30:</b> Nairobi-Fluss – verschiedene Probennahmepunkte	92-93
<b>Abb. 31:</b> AQUA-OPTOSENSOR mit Wasserproben aus dem Nairobi-Fluss mit mAk DDT 7C12-Oyster-645	96-97
<b>Abb. 32:</b> Analyse der Nairobi-Fluss-Sedimente mit AQUA-OPTOSENSOR (mAk DDT 1B2-Oyster <sup>®</sup> -645)	105



## Anhang B und C

<b>Abb. B1:</b> % Control mit DDT-mab Lib5-25 im Coating Antigen Format-ELISA	126-128
<b>Abb. B2:</b> Enzym Tracer Format-ELISA mit DDT-mab Lib5-25	129-130
<b>Abb. B3:</b> AQUA-OPTOSENSOR – Standardkurve für mAk DDT 1C1-Oyster-645	130
<b>Abb. B4:</b> AQUA-OPTOSENSOR – Standardkurve für mAk DDT 7C12-Oyster-645	131
<b>Abb. B5:</b> AQUA-OPTOSENSOR – Standardkurve für mAk DDT 1B2-Oyster-645	132
<b>Abb. B6:</b> Standardkurven mit <i>p,p'</i> -DDT in ELISA-Format mit mAk DDT 7C12 (125 ng/mL in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8) – Wasserproben aus München	132-133
<b>Abb. B7:</b> Standardkurven mit <i>p,p'</i> -DDT in AQUA-OPTOSENSOR-System mit mAk DDT 7C12-Oyster-645 (2 µg/mL in 2% (w/v) BSA in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8) – Wasserproben aus München	134
<b>Abb. B8:</b> ELISA im Coating Antigen-Format mit Nairobi-Wasserproben mit mAk DDT 7C12	135
<b>Abb. B9:</b> ELISA im Coating Antigen-Format mit Nairobi-Wasserproben mit mAk DDT 1B2	135
<b>Abb. B10:</b> ELISA im Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP, 1:8.000) mit Nairobi-Wasserproben und verschiedenen <i>p,p</i> -DDT-Dotierungen	136
<b>Abb. B11:</b> AQUA-OPTOSENSOR mit Nairobi-Wasserproben (mAk DDT 7C12-Oyster-645), Probennahmen am 16.09.05 und 23.09.05	137
<b>Abb. C1:</b> Übersicht zu den UV-Spektren	147-149

## Tabellenverzeichnis:

<b>Tab. 1:</b> Zahl der Malaria-Erkrankungen in einigen Staaten vor und nach den Bekämpfungsaktionen mit Insektiziden	2
<b>Tab. 2:</b> Kriterien für die Unterscheidung von Immunoassays bzw. Immunosensor (AQUA-OPTOSENSOR)	17
<b>Tab. 3:</b> Optimierte Testbedingungen für das Coating Antigen-Format (nach Abad et.al., 1997)	28
<b>Tab. 4:</b> Optimierte Testbedingungen für das Coating Antigen-Format (mAk Lib 5-25)	29
<b>Tab. 5:</b> Optimierte Testbedingungen für das Coating Antigen-Format (entwickelte Immunoreagenzien)	30
<b>Tab. 6:</b> Optimierte Testbedingungen für das Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP)	31
<b>Tab. 7:</b> Optimierte Testbedingungen für das Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-GOD)	32
<b>Tab. 8:</b> Im EI-SIM Modus gemessene Masse zur Ladung (m/z) von verschiedenen DDT-Derivaten und <sup>13</sup> C-markierten internen Standards	47
<b>Tab. 9:</b> Übersicht zu den UV-Spektren der Konjugate	50
<b>Tab. 10:</b> 4-Parameter-Werte und Kreuzreaktivitäten (% CR) im Coating Antigen-Format (mAk DDT 7C12)	55-56
<b>Tab. 11:</b> 4-Parameter-Werte und Kreuzreaktivitäten (% CR) im Coating Antigen-Format (mAk DDT 1B2)	56
<b>Tab. 12:</b> Testmittelpunkte [ $\mu\text{g/L}$ ] und Kreuzreaktivitäten (% CR) mit mAk Lib 5-25	58
<b>Tab. 13:</b> Kreuzreaktivitäten (% CR) mit mAk Lib 5-25	59
<b>Tab. 14:</b> Testmittelpunkte [ $\mu\text{g/L}$ ] und Kreuzreaktivitäten (% CR) von DDT-Isomeren und -Metaboliten im Coating Antigen-Format-ELISA mit DDT-Hapten-OVA <sup>1/4</sup> mit den neu entwickelten anti-DDT mAks	61
<b>Tab. 15:</b> Enzym Tracer-Format mit verschiedenen Vorbeschichtungen der MP	63
<b>Tab. 16:</b> Vergleich der Werte aus Literatur und eigener Ergebnisse - Kreuzreaktivitäten (% CR) mit mAk Lib 5-25	69
<b>Tab. 17:</b> Testmittelpunkte [ $\mu\text{g/L}$ ] und Kreuzreaktivitäten (% CR) von DDT-Isomeren und -Metaboliten im Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP) mit den neu entwickelten anti-DDT mAks	70

<b>Tab. 18:</b> Testmittelpunkte [ $\mu\text{g/L}$ ] und Kreuzreaktivitäten (% CR) von DDT-Isomeren und -Metaboliten im Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-GOD) mit den neu entwickelten anti-DDT mAks	70
<b>Tab. 19:</b> Wasserproben aus verschiedenen Gewässern in München - % Control im ELISA (Coating Antigen-Format) und AQUA-OPTOSENSOR	88
<b>Tab. 20:</b> Wasserproben aus verschiedenen Gewässern in München - AQUA-OPTOSENSOR und im ELISA (Coating Antigen-Format)	89
<b>Tab. 21:</b> ELISA im Coating Antigen-Format mit den Wasserproben aus dem Nairobi-Fluss	94
<b>Tab. 22:</b> ELISA im Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD) mit den Wasserproben aus dem Nairobi-Fluss	95
<b>Tab. 23:</b> Sediment-Analyse in ELISA-Format (Coating Antigen-Format und Enzym Tracer-Format) und GC/MS (mAk DDT 1C1)	100
<b>Tab. 24:</b> Sediment-Analyse in ELISA-Format (Coating Antigen-Format und Enzym Tracer-Format) und GC/MS (mAk DDT 7C12)	101-102
<b>Tab. 25:</b> Sediment-Analyse in ELISA-Format (Coating Antigen-Format und Enzym Tracer-Format) und GC/MS (mAk DDT 1B2)	103

## Anhang B

<b>Tab. B1:</b> 4-Parameter Werte - Optimierung in Enzym Tracer-Format	138
<b>Tab. B2:</b> 4-Parameter Werte - Optimierung in Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP) in verschiedenen Konzentrationen für DDT mAk 1C1	139
<b>Tab. B3:</b> 4-Parameter-Werte für <i>p,p'</i> -DDT in 40 mM PBS (pH 7,6-7,8) - Optimierungen in Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD) mit mAk DDT 7C12	140
<b>Tab. B4:</b> 4-Parameter-Standardkurven für <i>p,p'</i> -DDT in 40 mM PBS (pH 7,6-7,8) - Optimierungen in Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD) mit mAk DDT 1B2	141
<b>Tab. B5:</b> Enzym Tracer-Format mit mAk DDT 1C1, mAk DDT 1B2, mAk DDT 7C12, mit DDT-Hapten-HRP	142
<b>Tab. B6:</b> Zusammenfassung AQUA-OPTOSENSOR – DDT 7C12-Oyster <sup>®</sup> -645 – 4-Parametergleichung (in MS-Excel ausgewertet)	143-144
<b>Tab. B7:</b> Zusammenfassung AQUA-OPTOSENSOR – DDT 1C1-Oyster <sup>®</sup> -645 – 4-Parametergleichung (in MS-Excel ausgewertet)	144
<b>Tab. B8:</b> Zusammenfassung AQUA-OPTOSENSOR – DDT 7C12-Oyster <sup>®</sup> -645 – 4-Parametergleichung (in MS-Excel ausgewertet) (in 5% (v/v) Isopropanol)	145
<b>Tab. B9:</b> Zusammenfassung AQUA-OPTOSENSOR – DDT 1B2-Oyster <sup>®</sup> -645 – 4-Parametergleichung (in MS-Excel ausgewertet)	146

## Abkürzungsverzeichnis:

µg	microgramm
µL	microliter
Ag	Antigen
BSA	Rinderserumalbumin
CR	Cross-Reactivity (Kreuzreaktivität)
Da	Dalton
DDA	Dichlor-Diphenyl-Dichlorphenylethan
DDD	Dichlor-Diphenyl-Dichlorethan
DDE	Dichlor-Diphenyl-Dichlorethylen
DDT	Dichlor-Diphenyl-Trichlorethan
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EROD	7-ethoxy resorufin O-deethylase
EU	Europäische Union
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GOD	glucose oxidase
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP; POD	Meerrettich-Peroxidase
IgG, IgM, IgA, IgD, IgE	Immunoglobulin G, M, A, D, E
k	Kilo
KLH	Keyhole limpet haemocyanin (Megathura Crenulata)
L	Liter
LCB	LowCross Buffer
LOD	low limit detection
m	Mol
M	Molar
mAk	monoklonaler Antikörper
Mab	mAk
MAb	mAk
mAb	mAk
mg	Milligramm

min	Minute
mL	Milliliter
MP	Mikrotiterplatte (-n)
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
n	nano
ng	Nanogramm
<i>o</i>	ortho-
OD	Optische Dichte
OVA	ovalbumin
<i>p</i>	para-
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat gepufferte Salzlösung Wasch-Puffer
PCB	polychlorierte Biphenyle
PSWE	pressurized subcritical water extraction
pH	potentia Hydrogenium
ppb	parts per billion
upm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RLU	relative light units
RT	Raumtemperatur
SBSE	stir bar sorptive extraction
SD	Standardabweichung
SPE	Festphasenextraktion
SPR	surface plasmon resonance
TIRF	total internal reflection fluorescence
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit

# I EINLEITUNG

## 1 DDT-Geschichte

DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane], eines der bekanntesten Pestizide, wurde erstmalig im Jahre 1874 vom österreichischen Chemiker Othmar Zeidler synthetisiert. Die insektizide Wirkung entdeckte allerdings erst 1939 der Schweizer Paul Hermann Müller, der hierfür 1948 den Nobelpreis in Medizin erhielt (Müller, 1948).

Seit der Entdeckung der insektiziden Wirkung der chlorierten Substanz wurden weltweit mehr als 1 Million Tonnen dieses Pestizids eingesetzt, um die Ausbreitung von Insekten in der Land- und Forstwirtschaft zu kontrollieren, aber auch um Malaria und Typhus zu bekämpfen (Buser & Müller, 1995; Guardino et al., 1996; Kennish & Ruppel, 1996).

Die industrielle Produktion begann um 1940. DDT wurde zuerst zur Malariabekämpfung eingesetzt und später benutzte man es gegen alle Arten von Insekten. Militärisch war die Entdeckung von überragender Bedeutung, denn in der Vergangenheit hatte Malaria schon viele Armeen geschlagen, ohne dass ein Schuss gefallen war (Pollmer, 2000). Rekruten des zweiten Weltkrieges wurden zum Schutz vor Typhus, Malaria und anderen durch Insekten übertragbare Krankheiten mit DDT eingepudert und erhielten außerdem DDT-impregnierte Hemden. Nach 1945 wurde DDT überall als Pflanzenschutzmittel in der Landwirtschaft und dem Obst- und Gemüsebau angewendet (ATSDR, 2002).

Weltweit erkrankten jedes Jahr zwischen 1,5 und 2,7 Millionen Menschen neu an Malaria und sterben in den unterentwickelten Ländern jährlich fast eine Million Menschen, vor allem Kinder. Jahrtausendlang war die Menschheit der Malaria beinahe hilflos ausgeliefert (**Tab. 1**).

**Tab. 1: Zahl der Malaria-Erkrankungen in einigen Staaten vor und nach den Bekämpfungsaktionen mit Insektiziden**

(aus dem offiziellen Bericht der Weltgesundheitsorganisation, No 190, 1971).

<http://www.chemievorlesung.unikiel.de/1992-umweltbelastung/pesti2.htm>

Land	Jahr	Erkrankungsfälle
Italien	1945	411.602
	1968	37
Rumänien	1948	338.198
	1968	4
Bulgarien	1946	144.631
	1969	15
Türkei	1950	1.188.969
	1969	2.173
Venezuela	1943	817.115
	1958	800
Taiwan	1945	1.000.000
	1969	9

Die Erkrankungszahlen steigen seit Jahren auch in Deutschland, z.B. durch Mobilität des Menschen (Reisen), erschreckend an. 1996 wurden erstmals über 1.000 Malaria-Erkrankungen in Deutschland gemeldet (genau 1.027). Jedes Jahr sterben allein in der BRD etwa 10 bis 20 Menschen an Malaria. Ohne eine konsequente Behandlung kann diese Krankheit immer wieder ausbrechen. Wegen des in Schüben auftretenden Fiebers erklärt sich auch der deutsche Name "Rückfallfieber".

<http://members.aol.com/reisemed/krank/malaria.htm>

Im Jahre 1963 veröffentlichte die amerikanische Biologin Rachel Carson "Silent Spring", in dem sie sich mit der Wirkung des Pestizids beschäftigte (Attaran et al., 2000). Es dauerte acht Jahre, bis das amerikanische Umweltministerium schließlich eine Anhörung über DDT abhielt. Die Anwendung von DDT ist heute in den wichtigsten Industriestaaten verboten. Seit 1971 in der Schweiz, seit 1972 in den USA (US EPA, 1972; DDT-Gesetz, 1972). 1972 erließ die Bundesrepublik Deutschland ein Verbot der Ausbringung von DDT und 1978 ein Produktionsverbot. In der ehemaligen DDR und anderen osteuropäischen Ländern wurde DDT noch bis Ende der 80er Jahre eingesetzt (Schäfer et al., 1995).



Durch die Stockholmer Konvention (POPs-Konvention), Umweltprogramm der Vereinten Nationen, 17. Mai 2004, wurden die Herstellung und der Gebrauch von neuen Pestiziden (Aldrin, Chlordan, DDT, Dieldrin, Endrin, Heptachlor, Hexachlorbenzol, Mirex, Toxaphen) und einer Gruppe von Industriechemikalien (polychlorierte Biphenyle, Dibenzofurane, Dibenzodioxine) eingeschränkt bzw. verboten.

[http://www.pops.int/documents/convttext/convttext\\_en.pdf](http://www.pops.int/documents/convttext/convttext_en.pdf)

Kürzlich kamen die Debatten über die Verwendung von DDT wieder auf. Obwohl es einerseits in der Umwelt äußerst beständig ist, kann es andererseits zu einem annehmbaren Preis Millionen von Menschenleben schützen (Attaran et al., 2000; Roberts et al., 2000; Wendo, 2004; Rinaldi, 2004; Walter & Chen, 2005).

Der Einsatz von DDT, als wirksamstes Gift gegen die Malaria-Mücke, ist in vielen Ländern verboten. In Ostasien und in einigen tropischen Ländern wird DDT jedoch in vorsichtigem Einsatz in den Häusern verwendet, um krankheitsübertragende Insekten wie z.B. Moskitos unter Kontrolle zu halten (Kulke, 2005).

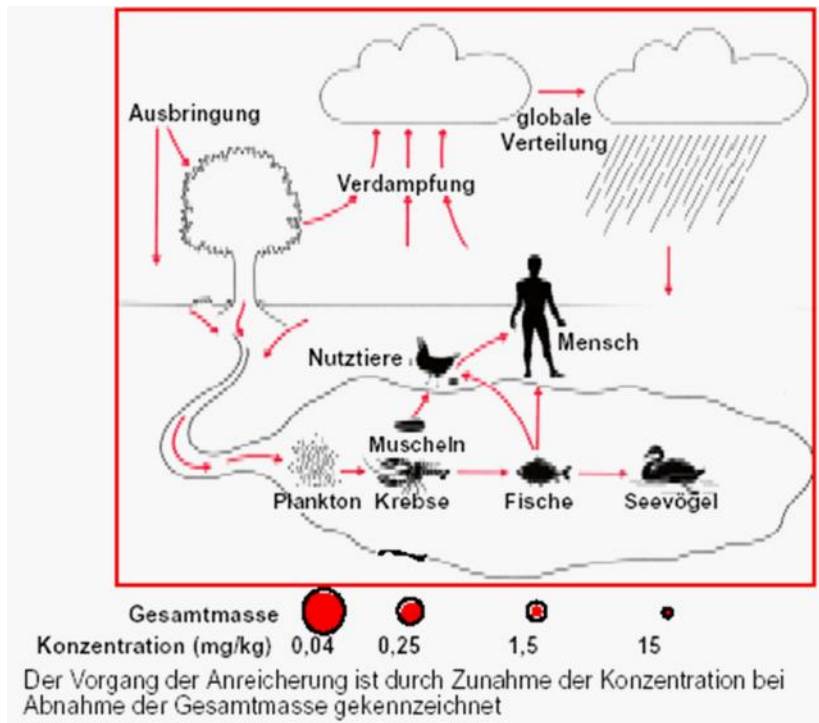
## 2 Problemdarstellung

Die Verwendung von Pestiziden ist weltweit so stark verbreitet, dass man sich kaum noch vorstellen kann, dass es irgendein Lebewesen gibt, welches nicht in Kontakt mit diesen Substanzen kommt. Vor allem die Verbindungen, die heutzutage zu den POPs (persistent organic pollutants) gezählt werden, kommen weltweit vor. Hier ist ein typischer Vertreter das DDT (**D**ichlor**d**iphenyl**t**richloroethan), das in Tieren (Eisbären, Robben, Wale, Walrosse, Fische) aus der Antarktis gefunden wurde, einer Gegend, die weit entfernt liegt von den Einsatzgebieten (Villa et al., 2006 a); Villa et al., 2006 b); Gamberg et al., 2005).

Pflanzenfressende Insekten wurden mit solchen chlorierten Kohlenwasserstoffen bekämpft. DDT galt ursprünglich als ideales Insektenvertilgungsmittel, weil es bereits in geringen, für Säugetiere und Menschen ungefährlichen Dosen die kleinen Tiere tödlich schädigt. Man wusste damals nicht, dass sich DDT in der Nahrungskette anreichert, dass also auf jeder Stufe der Nahrungskette die in organischen Körpern üblicherweise vorkommenden Substanzen abgebaut werden, nicht aber das DDT (Küster, 2005).

Exemplarisch ist in **Abb. 1** ein Schema zur Verbreitung und Anreicherung von DDT gezeigt. Persistente Verbindungen wie DDT werden von Lebewesen aufgenommen,

dabei wird die Menge im Verlauf der Nahrungskette angereichert, d.h. die Konzentration nimmt zu.



**Abb. 1: Verbreitung von DDT**

Schematische Darstellung der Verbreitung von DDT in der Umwelt durch großflächige Anwendung in der Landwirtschaft und Einschleusung in Nahrungsketten. In Anlehnung an: Vorlesung "Pharmakologie und Toxikologie", Prof. Dr. W. Dekant, Institut für Toxikologie, Universität Würzburg  
<http://132.187.168.3/lehre/V-Pestizide.pdf>

DDT kommt zunächst im Boden vor, gelangt dann in die Nahrungskette und schließlich in so großer Konzentration auch ins Fettgewebe von Mensch und Tier (Bioakkumulation), dass es auch für sie zum tödlichen Gift werden kann oder schwere gesundheitliche Schäden hervorrufen kann. DDT hat eine lange Abbauphase (Halbwertszeit 2-15 Jahre) (Graham & Campbell, 2001). Aufgrund der Langlebigkeit von DDT ist heute immer noch eine globale Hintergrundbelastung gegeben (Stroh, 2005).

Die Belastung mit DDT kann in Matrices wie Lebensmitteln, Muttermilch, Gewebe, Blut, Haare, Hausstaub, Raumluft, Baumaterialien und auch überall in der Biosphäre gefunden werden (Thomas et al., 2006; Luzardo et al., 2006; Bouwman et al., 2006; Beard et al., 2006; Kumar et al., 2006; Li et al., 2006; Sudaryanto et al., 2006; Marco & Kishimba, 2005; Ostrea et al., 2006; Dirtu et al., 2006; Jaraczewska et al., 2006; Oka et al., 2006).

Zahlreiche neue Forschungen zeigen, dass DDT und seine Metaboliten noch immer in vielen Grundsubstanzen in der Umwelt vorhanden sind einschließlich Böden, Sedimenten, alpinen Gletschern, Stadtluft, Biota, Wasser etc. (Howard, 1996; Martens et al., 2000; Kishimba et al., 2004; Hong et al., 2005; Scheyer et al., 2005; Villa et al., 2005). Der Grenzwert für ein einzelnes Pestizid nach der Richtlinie der Europäischen Kommission EC, 2000/60/EC) ist auf 0,1 µg/L festgesetzt und der Grenzwert von 0,5 µg/L für die Summenkonzentration. Entscheidend für die Beurteilung der gesundheitlichen Gefährdung ist der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) festgelegte ADI-Wert (acceptable daily intake). Dieser ADI-Wert beträgt für DDT 20 µg/kg Körpergewicht pro Tag DDT in Lebensmitteln und anderen Stoffen.

<http://www.stmugv.bayern.de/de/lebensmittel/index.htm>

Deshalb ist die Überwachung von Pflanzenschutzmittelrückständen eine wichtige Aufgabe der Wasserversorgungsunternehmen. Die einzelnen Quellen für Trinkwasser müssen regelmäßig überwacht werden, damit eine sichere Versorgung mit Trinkwasser gewährleistet wird (80/778/EC). Für die Gesundheit des Menschen und den Schutz der Umwelt ist es wichtig, bessere Möglichkeiten zur Detektion und Überwachung dieser Substanz (Grenzwert) in unterschiedlichen Wassermatrizes zu besitzen. Zur Analyse von DDT, seinen Isomeren und Metaboliten werden verschiedene Methoden angewendet. DDT wird in der Regel mit dem Gaschromatograph/Massenspektrometer (GC/MS) bzw. Gaschromatograph/Elektroneneinfangdetektor (GC/ECD) detektiert (z.B. EPA-Methode 8081; Saeed et al., 2001; Burke et al., 2003). In einer Arbeit von Columé et al., 2001, wurde für diesen Zweck DDT mit HPLC und MS untersucht. Abhängig vom Probenmaterial (Extraktion und Clean-up) benötigt man eine aufwändige Probenvorbereitung mit dem Einsatz von umweltschädigenden Lösungsmitteln (z.B. Hexan, Aceton). Diese Methoden sind ausreichend empfindlich und genau, jedoch komplex, teuer, zeitintensiv und sie benötigen große Mengen organischer Lösungen. Für ein Monitoring oder Screening ist ihr Einsatz zu aufwändig und für viele Länder nicht finanzierbar.

### **3 Metabolismus und Wirkungen des DDT**

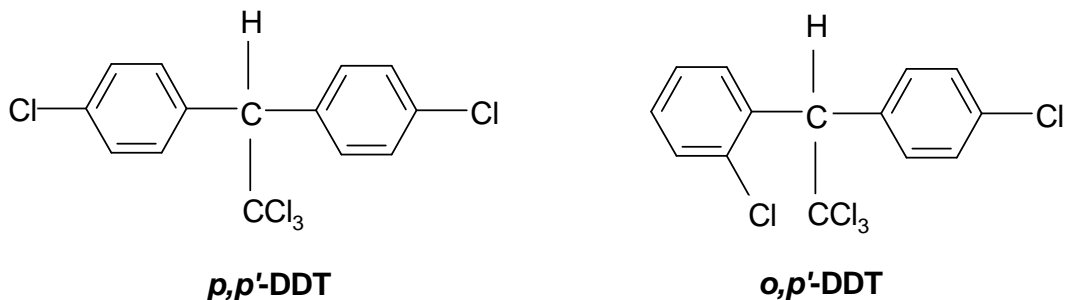
Generell liegt die östrogene Wirksamkeit von Umweltchemikalien um das 1.000-10.000fache niedriger als die der natürlichen Hormone. Ihre Bedeutung erlangten diese Substanzen aufgrund ihrer schlechten Abbaubarkeit und ihrer z.T. hohen Akkumulation im Organismus. Insbesondere als mögliche Ursache für Fortpflanzungsstörungen bei

Tier und Mensch geraten Umweltchemikalien immer wieder in die Diskussion (Stroh, 2005).

DDT gehört zu den chlorierten Kohlenwasserstoffen. Diesen werden als Substanzklasse gemeinhin Eigenschaften wie geringe Wasserlöslichkeit und Anreicherung in Leber, Nervensystem und Fettgewebe zugeschrieben.

Technisch betrachtet ist DDT eine Mischung aus bis zu vierzehn chemischen Komponenten, von denen die aktive Komponente *p,p'*-DDT (**Abb. 2, links**) nur ca. 65-80% ausmacht. Zu den übrigen Komponenten gehört *o,p'*-DDT (ca. 15-21%), welches eine östrogene Wirkung besitzt (**Abb. 2, rechts**) und für die negativen Wirkungen verantwortlich ist, und bis zu 4% *p,p'*-DDD. Im Gegensatz zu *p,p'*-DDT ist *o,p'*-DDT nur schwach insektizid (Metcalf, 1995; ATSDR, 2002).

<http://www.buetzer.info/fileadmin/pb/pdf-Dateien/DDT.pdf>



**Abb. 2: Struktur der beiden Isomere des DDT**

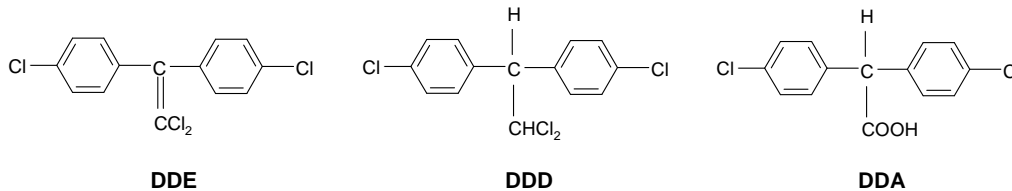
[1,1,1-Trichlor-2,2-bis-(4-chlorphenyl)ethan],  $C_{14}H_9Cl_5$ ; MG 354,5

[1,1,1-Trichlor-2-(*o*-chlorphenyl)-2-(*p*-chlorphenyl)ethan],  $C_{14}H_9Cl_5$ ; MG 354,5

Das wichtigste Abbauprodukt von DDT in der Umwelt ist DDE (1,1-Dichlor-2,2-bis(*p*-chlorphenyl)ethylen), welches aus DDT unter anderem durch den Einfluss von Licht gebildet werden kann (**Abb. 3, links**) und eine androgene Wirkung hat. Es zeigt sich, dass DDT und dessen Metaboliten in einem direkten Zusammenhang zu Reproduktionsstörungen stehen. Daneben entsteht auch das DDD (1,1-Dichlor-2,2-bis(*p*-chlorphenyl)ethan), das in Insekten und Warmblütern nachgewiesen wurde (**Abb. 3, Mitte**). Endstufe der Metabolisierung in Warmblütern ist das DDA, das mit dem Urin ausgeschieden wird (Römpf Chemie Lexikon, 1995; **Abb. 3, rechts**).

DDT und seine primären Metaboliten DDE und DDD sind sehr beständig und werden von Sedimenten und vom Erdreich stark absorbiert, die beide als Speicher und als Langzeitquellen für die Freisetzung wirken können (WHO, 1989).

In Tierversuchen an Mäusen ist beobachtet worden, dass DDT eine cancerogene (krebs-erzeugende) Wirkung besitzt (Greenlee et al., 2005; Hardell et al., 2004; Sapozhnikova et al., 2005). Die cancerogene Wirkung ist möglicherweise auf die hormonelle Wirksamkeit zurückzuführen.



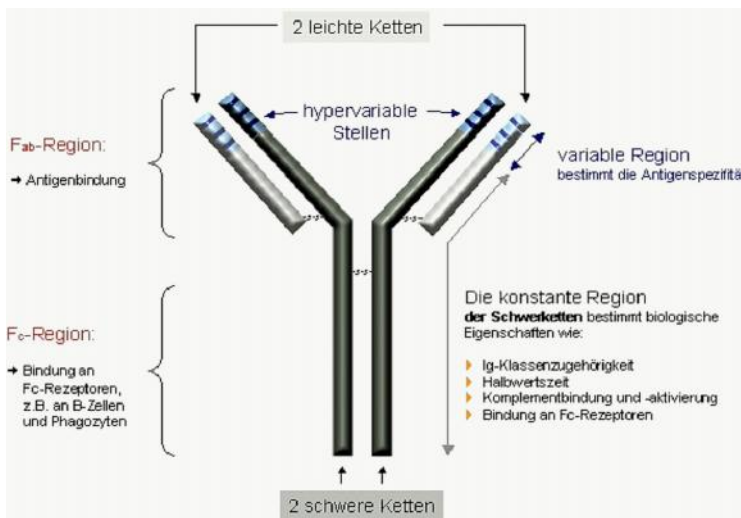
**Abb. 3: Metaboliten des DDT (DDE, DDD, DDA)**

## 4 Antikörper

Antikörper (Immunoglobuline) sind lösliche Glycoproteine mit Quartärstruktur, die innerhalb der humoralen Immunabwehr bei Vertebraten von B-Lymphozyten als Reaktion auf eine fremde Substanz (Immunogen, Antigen) gebildet werden. Die Stelle des Antikörpers, an welcher das Antigen gebunden wird, heißt Paratop und ist komplementär zur Antigen Determinanten (Epitop). Jedes einzelne Antikörpermolekül verbindet sich hochspezifisch mit nur einem Antigentyp, der auf seiner Oberfläche eine oder mehrere Epitope besitzt, die das „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung darstellen (Kennedy et al., 1986; Roitt et al., 1995).

Als Antigene werden vom Immunsystem nur Makromoleküle wie Proteine, Polysaccharide, Nukleinsäuren oder auch synthetische Polymere erkannt. Antikörper können nur gegen Stoffe mit einer Mindestgröße (Molmasse >5.000 Da) hergestellt werden (Tijssen, 1985). Deswegen sind die meisten Umweltchemikalien (Molmasse <1.000 Da) für die Stimulation einer Immunantwort nicht geeignet. Sie werden als Haptene bezeichnet. Durch Kopplung zwischen gewünschten Analyten und z.B. einem Protein stellt man Hapten-Protein-Konjugate her und so können Antikörper auch gegen kleine Moleküle hergestellt werden.

Immunglobuline (Ig) werden in 5 Klassen unterteilt: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE. Sie unterscheiden sich durch Molekülgröße und Aminosäuresequenz, und die meisten Typen zirkulieren in bestimmten Bereichen des Körpers oder sind an Lymphozyten gebunden. Die Immunglobuline gleichen sich in einem relativ langen Abschnitt, der sogenannten konstanten Region ( $F_C$ , crystallizing), unterscheiden sich aber in der sogenannten variablen Region ( $F_{AB}$ , fragment antigen binding). Die  $F_{AB}$ -Fragmente bestehen aus einer vollständigen leichten Kette und dem aminoterminalen Abschnitt einer schweren Kette. Das  $F_C$ -Fragment wird aus den carboxylterminalen Bereichen der beiden schweren Ketten gebildet (Abb. 4).



**Abb. 4: Struktur eines Antikörpers**

<http://www.hal-allerge.de>

Die Bindung zwischen Antigen und Antikörper kommt nur dann zustande, wenn das Antigen (bzw. das Epitop des Fremdmoleküls) und das Paratop komplementär zueinander passen. Die Bindung des Antigens an den Antikörper beruht auf der Bildung vieler schwacher, nicht-kovalenter Bindungen, wie:

- Wasserstoffbindungen (zwischen -OH, -NH<sub>2</sub>, und -COOH),
- elektrostatische Kräfte (zwischen den Amino- und Carboxylgruppen der Proteine),
- Van der Waals-Kräfte und
- hydrophobe Wechselwirkungen.

Diese Bindungen zwischen Antigen und Antikörper sind umso stärker, je geringer der Abstand zwischen Antigen und Antikörper ist, die Bindungsstabilität wird durch pH-Wert und Temperatur beeinflusst (Phillips, 1989).

### ***Monoklonale Antikörper***

Monoklonale Antikörper (mAKs) sind Antikörper, die von einer Population identischer Plasmazellen (einem Klon) synthetisiert werden. Sie sind vollständig homogene Antikörper und erkennen alle dasselbe Epitop eines Antigens (Galfre & Milstein, 1981; Stryer, 1996). Solche Antikörper gegen eine beliebige Substanz können heute in großen Mengen gewonnen werden. Die Antikörper werden in permanent wachsenden Hybridomzellen produziert, die durch Fusion von Milzzellen eines immunisierten Spenders (Maus oder Ratte) mit einer Krebszelllinie erhalten werden (Baron, 1995). Dies ermöglicht den vielfältigen Einsatz von monoklonalen Antikörpern in Forschung und Medizin. Für die Entwicklung der Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurden G. Köhler und C. Milstein 1984 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Man kann die monoklonalen Antikörper wie folgt kennzeichnen:

- Menge ist unbegrenzt (Vorrat),
- Affinität konstant (einheitlich),
- Möglichkeit zur Beeinflussung der Selektivität beim Screening und
- Kreuzreaktionen sind einheitlich.

Grundlage der Hybridtechnik von Milstein und Köhler ist die Zellfusion immunglobulinproduzierender Lymphozyten (B-Zellen) aus einem Spender (z.B. Ratte) mit Blutkrebszellen (Myelom-Zellen), die die Fähigkeit zur uneingeschränkten Vermehrung in vitro besitzen (Köhler & Milstein, 1975).

### ***Polyklonale Antikörper***

In einer normalen Abwehrreaktion werden immer mehrere B-Zellen zur Produktion von Antikörpern angeregt. Weil aber jede B-Zelle sich genetisch ein ganz klein wenig von der anderen unterscheidet, sind auch die produzierten Antikörper verschieden. Deshalb spricht man von polyklonalen Antikörpern (pAKs) (Friemel, 1980).

Dieses breite Bindungsspektrum auszunutzen ist sinnvoll, weil die Antikörper auch dann wirken, wenn sich die Oberfläche geringfügig verändert. Andererseits ist aber das breite Bindungsspektrum polyklonaler Antikörper ein Nachteil, weil es auch die Bindung an Antigene ähnlicher Oberflächen erlaubt. So sind Kreuzreaktionen möglich, die nicht beabsichtigt sind (van Emon & Lopez-Avila, 1992).

Man kann die polyklonalen Antikörper wie folgt kennzeichnen:

- Ein polyklonales Serum (z.B. von Kaninchen, Schaf, Ziege) ist je nach Tier unterschiedlich und nur begrenzt verfügbar,
- pAks sind nicht so selektiv wie die monoklonalen,
- Herstellung ist einfacher, schneller, kostengünstiger als die der monoklonalen.

### ***Rekombinante Antikörper***

Im Verlauf der letzten Jahre ist die Herstellung von rekombinanten Antikörpern durch die Fortschritte im Bereich der Gentechnologie möglich geworden. Bei diesem Verfahren beschränkt man sich meist auf die Herstellung von Antikörperfragmenten, welche die Bindungsstelle erhalten. Spezifische Antikörper werden aus der Bibliothek selektiert ohne Notwendigkeit zur Immunisierung und können kostengünstig produziert werden (Breitling & Dübel, 1997).

## **5 Immunoassays**

Immunoassays sind die am weitesten verbreitete Anwendung der immunochemischen Analytik. Ein Immunoassay ist eine Technik, bei der mittels einer immunologischen Reaktion der qualitative und/oder quantitative Nachweis einer Substanz geführt wird. Es findet eine Antigen-Antikörper-Reaktion statt. Immuntests basieren auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion, d.h. auf der Fähigkeit der Antikörper, spezifische Antigene zu erkennen und mit ihnen eine Bindung einzugehen.

ANTIGEN + ANTIKÖRPER  $\Leftrightarrow$  ANTIGEN-ANTI-KÖRPER-KOMPLEX

Der konventionelle **ELISA** (**E**nzyme **L**inked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay – Enzymgekoppelter Immunnachweis) wurde in dieser Arbeit als Screening-Test für die quantitative Detektion von DDT und Metaboliten und die Charakterisierung mAks für DDT eingesetzt.

Die Technik des ELISA wurde 1971 durch Engvall und Perlman entwickelt. Alle Reaktionen des ELISA finden mit einem immobilisierten Partner statt, was die Trennung von gebundenen und nicht gebundenen Reagenzien erheblich erleichtert. Das Antigen wird an einer Plastikoberfläche unter bestimmten Bedingungen zwar nicht kovalent, aber mit erstaunlicher Festigkeit gebunden.



Die Empfindlichkeit des ELISA ist von verschiedenen Faktoren abhängig:

- Affinität des Antikörpers,
- Eigenschaften und Molekulargewicht der zu bestimmenden Komponenten,
- Reinheit der enzymmarkierten Immunreaktanten und des Markierungsgrades,
- Nachweisbarkeit der verwendeten Enzymmarkierung,
- Testbedingungen, z.B. Testprinzip, Inkubationsbedingungen, Trennverfahren.

Immunoassays lassen sich in kompetitive, nicht-kompetitive, homogene und heterogene einteilen. In kompetitiven Tests werden Antikörper eingesetzt, um deren Bindungsstelle der Analyt mit einem Enzym Tracer oder Coating Antigen konkurriert. Dieses Prinzip kann in zwei Testformaten angewendet werden: **direkt** (Enzym Tracer-Format) **ELISA** oder **indirekt** (Coating Antigen-Format) **ELISA**. Beide Formate wurden in dieser Arbeit eingesetzt. Nicht-kompetitive Tests arbeiten mit einem Überschuss an Antikörpern. Es werden die vom Analyt besetzten Antikörperbindungsstellen mit Hilfe eines zweiten Antikörpers detektiert. Sie sind meist sensitiver als kompetitive Tests. Bei den meisten nicht-kompetitiven Tests (Sandwich-Immunoassays) wird das Antigen von zwei Antikörpern gebunden, die beide im Überschuss vorhanden sind. Das Testverfahren ist für Haptene nicht einsetzbar, da die Analyte mindestens zwei Bindungsstellen für Antikörper tragen (Hock, 1993).

Weiterhin können Immunoassays sogenannte **homogene** und **heterogene** Tests sein. Im heterogenen Test ist der Antigen-Antikörper-Komplex getrennt von den freien Antikörpern bzw. freien Antigenen. Im homogenen Test ist keine solche Trennung zwischen dem Antigen-Antikörper-Komplex und dem freien Antigen bzw. Antikörper notwendig, und die Enzymmarkierung ändert sich direkt proportional zur Antigen-Antikörper-Wechselwirkung.

In dieser Arbeit wurde ein **kompetitiver direkt** und **indirekt ELISA** angewandt.

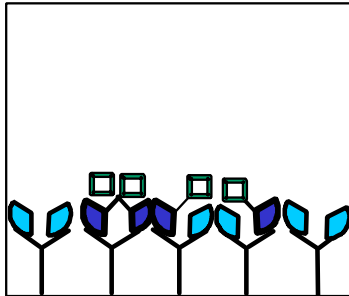
In **Abb. 5** wird der schematische Ablauf eines **direkt** (Enzym Tracer-Format) und **indirekt** (Coating Antigen-Format) **kompetitiven ELISAs** gezeigt.

Allgemein sind Immunoassays noch relativ aufwändig in der Durchführung. Viele Pipettier- und Waschschrte sind während des Assays notwendig.

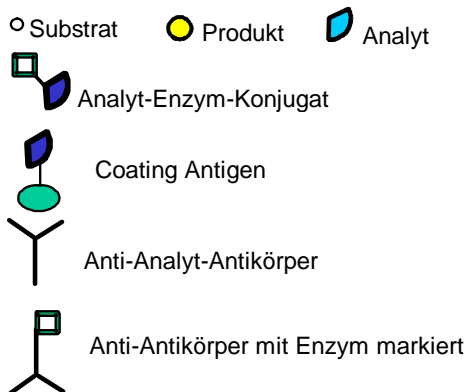
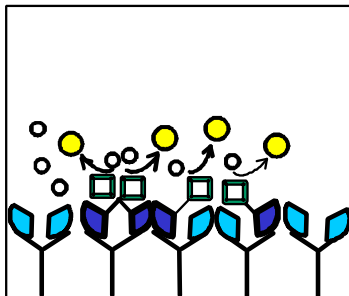
**Direkter kompetitiver ELISA**

Ein Trägermaterial (z.B. Polystyrol) ist mit Anti-Analyt-Antikörpern (Ak) beschichtet.

Analyt (Umweltchemikalie) und Analyt-Enzym-Konjugat werden zugegeben und konkurrieren um die limitierten Bindungsstellen der Anti-Analyt-Ak.



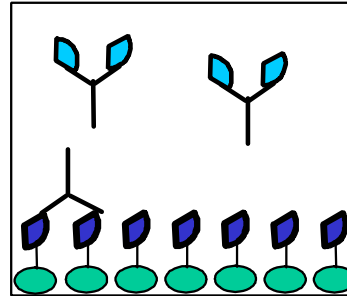
Nach Trennung von gebundenen und ungebundenen Molekülen (Waschschritte) und Zugabe von Substrat für die Enzymreaktion erhält man ein zur Analytkonzentration umgekehrt proportionales Ergebnis.



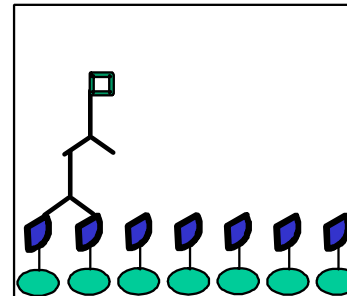
**Indirekter kompetitiver ELISA**

Ein Trägermaterial (z.B. Polystyrol) ist mit einem Coating-Antigen beschichtet.

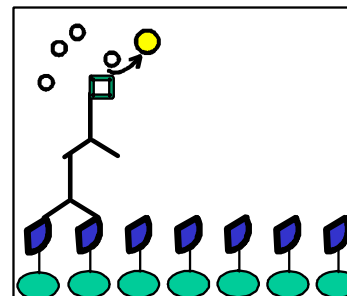
Freier Analyt und Coating-Antigen konkurrieren um die limitierten Bindungsstellen der Anti-Analyt-Ak.



Nach Trennung von gebundenen und ungebundenen Molekülen (Waschschritt) wird ein Anti-Antikörper (mit Enzym markiert) hinzugefügt.



Nach einem weiteren Waschschritt und nach Zugabe von Substrat für das Enzym erhält man ein zur Analytkonzentration umgekehrt proportionales Ergebnis.



**Abb. 5: Vergleich von direkt (links) und indirekt (rechts) kompetitivem ELISA (Krämer, 2002)**

Der erste kompetitive Immunoassay wurde von Yalow & Betson, 1959 zur Bestimmung von Insulin durchgeführt, sein großer Vorteil war die hohe Empfindlichkeit.

In den 80er Jahren war man weiter auf der Suche nach alternativen und kostengünstigeren Methoden, und die immunochemischen Analysenmethoden wurden als ein sehr gutes Potential als Screening Methode entdeckt (Hammock & Mumma, 1980; Hammock et al., 1990; Meulenberg et al., 1995; Hammock et al., 1987; Rogers, 1995; Marty et al., 1995; Krämer, 1996; van Emon & Gerlach, 1998; Selby, 1999; van Emon, 2001; Mallat et al., 2001; Krämer et al., 2005).

Aufbauend auf diese Methoden wurden mAKs gegen DDT von Abad et al., 1997 entwickelt und in verschiedenen immunochemischen Techniken angewendet, wie chemiluminescent flow immunoassay (Botchkareva et al., 2002) und chemiluminescent ELISAs (Botchkareva et al., 2003).

In der Zwischenzeit wurden sie für fast alle gängigen Pestizide, aber auch für Umweltchemikalien entwickelt. Viele sind auch als kommerzielle Produkte (Firma Coring) in Form von Test-Kits verfügbar (Meulenberg et al., 1995; Dankwardt, 2000).

Mehrere kommerzielle ELISA-Kits von US-Firmen für den Nachweis von DDT-Rückständen in Wasser, Boden, Sediment und Fischplasma stehen zur Verfügung (z.B. EnviroLogix Inc.: DDT Test-Kit für Boden und andere Matrices, Strategic Diagnostics Inc.: EnviroGard DDT in Boden, Abraxis DDE/DDT Assay Kit 96T in Wasser). Die EPA (Environmental Protection Agency, USA) hat bereits den EnviroGard™ DDT Test-Kit für Boden mit einer Methodennummer registriert (Method 4042, EPA 1996). Als zusätzliche Techniken können gaschromatographische (Method 8081, EPA 1996) oder chromatographie/massenspektrometrische (Method 8270, EPA 1996) Methoden eingesetzt werden.

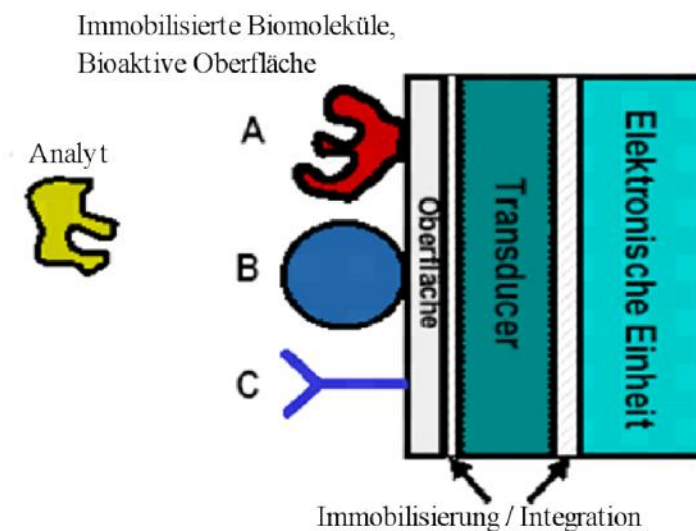
Für alle diese Test-Kits werden polyklonale Antikörper verwendet.

Für DDT wurden bereits mehrere Immunoassays von verschiedenen Forschergruppen und auch von Firmen entwickelt (Banerjee, 1987; Banerjee et al., 1996; Beasley et al., 1998; Burgisser et al., 1990; Abad et al., 1997; Giraudi et al., 1998; Hochel & Musil, 2002; Anfossi et al., 2004; Centeno et al., 1970; Valentini et al., 2003; Hong et al., 2003). Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) sind bereits als schnelles Screening und/oder sensible quantitative Mittel zur Pestizidanalyse bekannt (Krämer et al., 2004; 2005), sie sind jedoch anfällig für Pipettenfehler und ungeeignet für Umweltanalysen vor Ort (Skark et al., 1998; Thurman & Cromwell, 2000).

Man muss deshalb neue Wege beschreiten bei der Entwicklung immunochemischer Techniken für schnelle, empfindliche, kostengünstige, einfache, automatische oder halbautomatische Anordnungen, die ohne große Probenvorbereitungen und Proben-transfers in einem analytischen Labor ausgeführt werden können (van Emon & Lopez-Avila, 1992; Franek & Hruska, 2005).

## 6 Immunosensoren

Die Immunosensoren sind eine Weiterentwicklung von Immunoassays, die als biochemische Erkennungseinheit Antikörper, Enzyme oder auch ganze Zellen für die Erkennung von Analyten nutzen (Turner et al., 1987; Bossi et al., 2000), **Abb. 6**.



**Abb. 6:** Schematischer Aufbau eines Biosensors, hier: Immunosensor  
Aus: Krämer, 1996, 2003.

Da die Darstellung der Bindungsreaktion zwischen Antikörper und Analyt nicht direkt gemessen werden kann, bedient man sich eines Labels oder Markers. Hier wurde ein Enzym als Label zum Einsatz gebracht.

A: z.B. Enzym,

B: z.B. Zelle,

C: Antikörper

Antikörper-basierte Biosensoren (Immunosensoren), in denen sich der Antikörper oder das Antigen auf einem Signalwandler (Transducer, der das aus der biochemischen Reaktion entstehende Signal in ein messbares Signal umwandelt) findet, wurden auf verschiedene Arten gebaut.

Die Immunosensoren fallen jedoch generell unter eine von drei Grundkonfigurationen. Zu diesen Formaten gehören nicht-kompetitive Assays (direkt oder indirekt) und kompetitive Assays oder Sandwich-Typen von Assay-Formaten (Rogers, 2000).

In den vergangenen 20-30 Jahren sind einige optische Methoden etabliert worden. Man unterscheidet zwischen Methoden, die markierungsfreie Techniken (z.B. surface plasmon resonance, SPR) oder markierte Komponenten (z.B. total internal reflection fluorescence, TIRF) benötigen. In Kombination mit immunologischen Erkennungsreaktionen werden sie zu attraktiven, einfachen analytischen Sensortechniken (Marty et al., 1998).

Nach den Vorgaben der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) muss zwischen Biosensoren und Immunoassays unterschieden werden (Krämer, 1996). Während sich elektrochemische Biosensorsysteme zur Messung von niedermolekularen Stoffwechselsubstanzen bereits in größerer Zahl als sogena Point-of-Care-Testing“ (POC)-Systeme im klinischen Labor etabliert haben, wurden Immunosensoren, zumindest theoretisch, ebenfalls als wichtige Weiterentwicklung auf dem Gebiet der Immunoassay-Technologie angesehen. Obwohl viele wissenschaftliche Artikel auf diesem Gebiet veröffentlicht wurden, sind nur wenige klinisch und kommerziell erfolgreiche Applikationen der Immunosensortechnik bekannt. Die Gründe hierfür liegen in verschiedenen Bereichen wie der Immobilisation der Biokomponente, der Orientierung und der spezifischen Eigenschaften der Antikörper bzw. antikörpervergleichbaren Komponenten auf der jeweiligen Transduceroberfläche (Luppa, 2001).

Nach dieser Methode werden in der Lebensmittelanalytik und in der Umweltanalytik Immunosensoren zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Pestiziden (Hammock & Mumma, 1980; Nelson et al., 1995; Meusel et al., 1998; Bier et al., 1992; Shriver-Lake et al., 1995; van Emon & Gerlach, 1995; Hale et al., 1996; Gauglitz, 2005; Brecht & Gauglitz, 1997) sowie nanomechanische Biosensoren mit direkter Messung der Antikörper-DDT-Bindung (Alvarez et al., 2003) und optische Immunosensoren für DDT-Bestimmungen (Mauriz et al., 2006 a), Mauriz et al., 2006 b)) eingesetzt.

Die Verwendung von Biosensoren hängt von der gewünschten Qualität der analytischen Ergebnisse (Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit, Stabilität) und auch von der Akzeptanz der Anwender (Preis, Service, Handhabung) ab. Biosensoren haben den Vorteil, dass sie einfacher und komfortabler in der Handhabung sind, über ein variables Probenvolumen und eine große Auswahl an funktionellen Sensor-Chipoberflächen verfügen sowie kleiner und reversibel im Signal sind und z.T. automatisiert werden können.

Sie brauchen keine aufwändige Probenvorbereitung, sind sehr spezifisch und liefern schnell Ergebnisse (Gonzalez-Martinez et al., 1999).

Diese Technologien sind in Zukunft als eine kostengünstige, schnelle, umweltfreundliche und einfache Screeningmethode in der Umweltanalytik zu sehen. Hier können die Immunosensoren qualitativ und quantitativ verwendet werden. Sie bieten eine gute Möglichkeit, Umweltproben einfacher, billiger, schneller und vor Ort zu messen, um ein Field-Screening zu ermöglichen (Roger & Mascini, 1998). Die Field-Screening-Methoden sind kostengünstige Alternativen, die auch als Exportartikel für Länder im Osten Europas oder für die Dritte Welt zunehmend interessant werden (Weber et al., 2005).

Das optische AQUA-OPTOSENSOR-System wurde ursprünglich für die medizinische Diagnostik entwickelt (Schult et al., 1999), parallel dazu erfolgte die Anwendung auf dem Gebiet der Umweltanalytik für Monitoring von 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Meusel et al., 1998).

Das AQUA-OPTOSENSOR-System besteht aus einem Grundgerät und Einweg-Chip und wurde zur quantitativ-diskontinuierlichen Messung von Einzelproben automatisiert. Diese Sensor-Chipoberfläche ermöglicht die Immobilisierung von nichtkovalenten Bindungen mittels einer Affinitätsreaktion. Weitere Tests sollen zum Einsatz des Systems beim Nachweis unterschiedlicher Substanzen (Multianalyt-Immunosensor) führen (Räuber & Krämer, 2006).

Die Kriterien für die Unterscheidung von Immunoassays bzw. Immunosensor (AQUA-OPTOSENSOR) sind in **Tab. 2** dargestellt.

**Tab. 2: Kriterien für die Unterscheidung von Immunoassays bzw. Immunosensor (AQUA-OPTOSENSOR)**

<i>ELISA</i>	<i>AQUA-OPTOSENSOR</i>
Biochemische spezifische Analyterkennung, Biochemische Reaktion und Detektion erfolgen in zwei getrennten Schritten.	Biochemische spezifische Analyterkennung, Das Gemisch (Oyster markierter Antikörper/Analyt) wird über die Oberfläche des Einweg-Sensors zugegeben, auf der sich das Coating-Antigen befindet. Die Fluoreszenz des mit Oyster markierten Antikörpers ist über eine Anregung mit Laserlicht im evaneszenten Feld detektiert.
Mikrotiterplatte, Photometrische Detektion (als Marker werden Enzyme verwendet), Ein Test dauert ca. 4 Stunden.	Einweg-Sensoren, Fluoreszenzbasiertes System (als Marker wird Farbstoff verwendet), Liefert sehr schnell Ergebnisse, Proben lassen sich innerhalb von ca. 35 min. bestimmen.
Der Kostenfaktor für die Untersuchung der Proben im Labor ist hoch; und es können Pipettierungsfehler auftauchen.	Automatisierte Messabläufe und Datenauswertungen, Empfindlich, vereinfachte Handhabung, ermöglicht schnelles Screening, Pipettierungsfehler können vermieden werden.
Volumenprobe/Kavität: 100 µL-150 µL.	Volumenprobe/Sensor-Chip/Messung: 100 µL-150 µL.

## 7 Aufgabenstellung

Im ersten Schritt dieser Promotionsarbeit soll die Palette der gegen DDT gerichteten monoklonalen Antikörper erweitert werden. Die Veröffentlichung der Gruppe von Prof. Montoya (Polytechnische Universität, Valencia, Spanien) bildete für die geplanten Arbeiten die Grundlage (Abad et al., 1997).

Es sollten mAKs zum Nachweis von DDT hergestellt und ELISAs mit diesen anti-DDT mAKs entwickelt werden. Die Optimierung, Charakterisierung, Bestimmung von Kreuzreaktionen und Lösungsmittelverträglichkeit stehen durch konventionelle ELISA der neu entwickelten anti-DDT mAKs in verschiedenen Formaten (Coating Antigen-Format und Enzym Tracer-Format) an.

Im zweiten Schritt dieser Promotionsarbeit wird die Anpassung und Optimierung des entwickelten Immunoassays an das Format des Immunosensors AQUA-OPTOSENSOR für DDT-Bestimmung behandelt. Im optischen AQUA-OPTOSENSOR-System wurden die fluoreszenzmarkierten anti-DDT mAKs zur Analyterkennung angewendet.

Für diesen Aufbau sollten anti-DDT mAKs mit einem Fluoreszenzfarbstoff Oyster<sup>®</sup>-645 konjugiert werden. Durch Totalreflexion eines Lichtstrahls wird ein evaneszentes Feld erzeugt und die Moleküle werden an der Transduceroberfläche angeregt.

Im dritten Schritt dieser Promotionsarbeit sollen Messungen von Wasserproben mit unterschiedlichen Methoden (konventioneller ELISA und AQUA-OPTOSENSOR)

verglichen werden. Nairobi-Wasserproben sollten auch vor Ort in direkter Zusammenarbeit mit der University of Nairobi gemessen werden. Die mit dem AQUA-OPTOSENSOR-System erzielten Resultate werden mit denen des konventionellen ELISA verglichen.

Der letzte Aufgabenbereich ist die Entwicklung einer Schnellextraktion für Nairobi-Sedimente und Anpassung an Immunoassays, Immunosensor und Referenzanalytik.

## **8 Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Diese Arbeit wurde im Rahmen des EU-Projektes "Pollution Monitoring in the Nairobi River: Application of New and Robust Biosensor Technologies Adapted to Locally Available Resources" (AQUA-SCREEN; Projektlaufzeit: Dezember 2002 bis Mai 2006) ermöglicht.

Das Projekt wurde in Kooperation mit folgenden Wissenschaftlern durchgeführt:

Dr. Francis Mulaa, University of Nairobi, Kenia,

Prof. Dr. Paul Shiundu, University of Nairobi, Kenia,

Dr. Thomas Egwang, Med Biotech Laboratories, Kampala, Uganda,

Dr. Markus Meusel, ICB-GmbH, Münster,

Dr. Peter Rauch, CANDOR Bioscience GmbH, Münster,

Dr. Wolfgang Kleiböhmer, ICB-GmbH, Münster und

Prof. Dr. Calum McNeil, University of Newcastle upon Tyne, England.

Die Entwicklung der monoklonalen Antikörper gegen DDT, Immunisierung von Ratten und Subklonierung erfolgte durch Frau Dr. E. Kremmer, Institut für Molekulare Immunologie, GSF.

Im Rahmen dieses Projekts wurde der optische Biosensor AQUA-OPTOSENSOR für die Überwachung von Pestiziden im Nairobi-Fluss eingesetzt. Als Ansprechpartner und für die weitere Zusammenarbeit mit AQUA-OPTOSENSOR stellten sich die Siemens AG, München, Deutschland, und Diagnosesysteme GmbH, Leipzig, Deutschland, zur Verfügung, die auch bei Problemen mit dem Immunosensor helfen konnten.



## II MATERIAL UND METHODEN

### 1 Immunoassays

#### 1.1 Allgemeine Materialien

- Mikrotiterplatten (Nunc F-96 MaxiSorp™), Nunc, Wiesbaden, Deutschland.
- Dialyse Kassetten 0,5-3 mL, Pierce Dialyse Cassette Slide-A-Lyzer™ 10.000, Pierce, Rockford, USA.
- Extra-Strength, Nadeln Sterican 0,60 x 25 mm, 1,20 x 40 mm und Spritzen Omnifix (1, 5, 10, 20 mL), B. Braun Melsungen, Deutschland.
- Filtereinheit / Filter unit, Sparteau 13/0,2 RC, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland.
- Pipettenspitzen, Protein LoBind Reaktionsgefäße und Polypropylen mit Verschluss, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland.
- Bechergläser, Erlenmeyerkolben (50, 100, 250 mL), Glaszylinder (25, 50, 100, 250, 1.000 mL), Duran, Mainz, Deutschland.
- 50 mL Reagent Reservoir, Corning Incorporated, Costar, Cambridge, USA.
- Offene Plastik-Röhrchen, Acryl-Plastikständer, Testgläschen mit Schraubverschluss für die Probenverdünnungen, Schnappdeckelgläschen mit Deckel, Pasteurpipetten mit Silikonhütchen, Neolab, Heidelberg.

#### 1.2 Allgemeine Arbeitsgeräte

- Pipette einstellbar für 1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 200-1.000 µl, 1.000-10.000 µl, Multipipetten® plus einstellbar, Eppendorf Response Mehrkanal (8-Kanal- und 12-Kanal-Pipetten), einstellbar für 20-200 µl, 20-300 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland.
- Für die Durchmischung von Lösungen wurde ein Minishaker, Vortex, Lab Safety Supply, Inc, Janesville, WI, USA, mit variabler Motorstärke benutzt.
- Inkubator 1.000, MR 1.000 Magnetrührer, Heidolph Instruments GmbH & Co, KG, Schwalbach, Deutschland.
- VARIOMAG Magnetrührer, POLY 15, H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland.

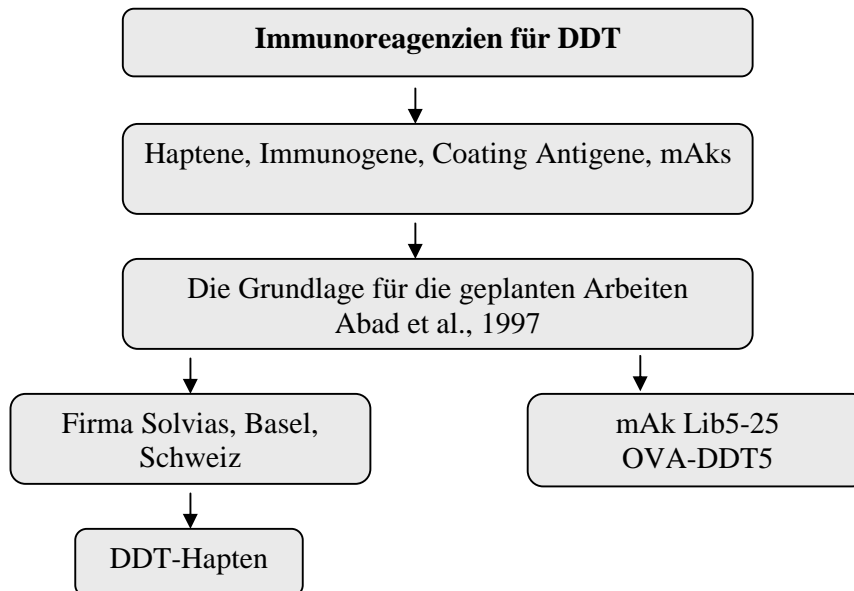
- Das Waschen der Mikrotiterplatten geschah mit einer semi-Automat Nunc Immunowash, Roskilde, Dänemark, oder mit Automat Mikrotiterplatten washer ELX405R, Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland.
- Die Testauswertung der Mikrotiterplatten wurde mit ThermoMax Reader, Molecular Devices, Palo Alto, USA, unter der Verwendung der Software SOFTmax<sup>®</sup> Pro, 3.0, Molecular Devices, Palo Alto, USA, bei 450 nm (Referenzwellenlänge von 650 nm) vorgenommen. Zur Darstellung von Inhibitionskurven wurde die 4-Parameter Logistik Formel (SOFTmax<sup>®</sup> Pro, 3.0, Molecular Devices, Palo Alto, USA) verwendet.
- pH-Einstellungen wurden mit einem pH-Meter der Firma Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & co KG, Weilheim, Deutschland, durchgeführt.
- Das Abwiegen der Reagenzien wurde auf einer Präzisionswaage und Analysenwaage, Sartorius analytic, Uting, Deutschland, vorgenommen.
- Zentrifuge, Heraeus Biofuge 15; Kendro Laboratory Products, Asheville, NC, USA.
- Trockenschrank, Hanau, Deutschland.
- UV-VIS scans; 240-450 nm; Ultraspec 3000, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA.

### **1.3 Allgemeine Immunoreagenzien**

- Maus-anti-Ratte mAk TIB-172 (k-specific) und LA 1B12-2-1 (Anti- $\lambda$ ) wurden am Institut für Molekulare Immunologie, München, Deutschland, hergestellt.
- Ziege-anti-Maus IgG, Ziege-anti-Maus gekoppelt an POD, Protein A, Protein G, Protein A/G, Pierce, Biotechnology, USA.
- mAk Lib 5-25, OVA-DDT-5, Polytechnic University Valencia, Spanien.
- Ziege-anti-Ratte gekoppelt an POD, rat IgG+IgM Antikörper, Dianova, Hamburg, Deutschland.
- -IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -kappa, ATCC, Manassas, VA, USA.
- -IgM, Alexis, Grünberg, Deutschland.
- -IgG2c, Ascenion, München, Deutschland.
- Protein G-Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden.

## 1.4 Herstellung der neuen Immunoreagenzien für DDT

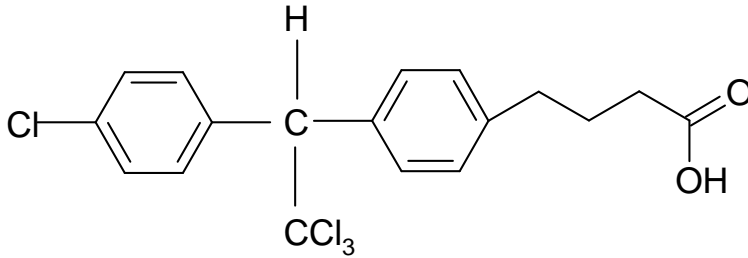
Für die Entwicklung der neuen Immunoreagenzien für DDT sind verschiedene Schritte erforderlich. Einen Überblick soll die **Abb. 7** vermitteln.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der Entwicklungsschritte der benötigten Immunoreagenzien für DDT

Die Haptene für das Immunogen sind sehr wichtig für die Entwicklung der Antikörper (Hammock et al., 1990). Die Arbeit von Abad et al., 1997 gibt bereits wichtige Hinweise zu unterschiedlichen Strukturen, die zur erfolgreichen Entwicklung von anti-DDT Antikörpern führten. Anhand dieser Arbeit wurde ein Hapten (**Abb. 8**) synthetisiert (extern durch Firma Solvias AG, Basel, Schweiz). Das Hapten wurde in dieser Doktorarbeit sowohl für die Immunisierung von Ratten als auch für die anschließende Assay-Entwicklung eingesetzt. Dieses Derivat des DDT besitzt einen  $\text{CH}_2$ -Spacer und eine Carboxylgruppe.

Letztere dient zur kovalenten Bindung an die Proteine. Die Richtigkeit der Struktur wurde u.a. anhand von NMR-Daten bestätigt (Dr. Norbert Hertkorn, IÖC, GSF).



**Abb. 8: Struktur des DDT-Derivats Hapten**  
(4-{4-[1-(4-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethyl]phenyl}butanoic acid

### 1.4.1 Synthese der Hapten-Protein-Konjugate

Die Herstellung der Hapten-Protein-Konjugate war notwendig, um die Immunisierungen von Ratten durchzuführen. Die Konjugate können in Coating Antigen-Format-ELISA eingesetzt werden und stehen daher auch für spätere Anwendungen im Immunosensor zur Verfügung.

Die Herstellung der Hapten-Protein-Konjugate für DDT erfolgte mit einer modifizierten Aktiv-Ester Methode von Langone & Van Vunakis (1975).

Der Ablauf pro einfachen Ansatz für ein Protein war wie nachfolgend beschrieben:

#### *Methode A*

- 0,200 mmol des DDT-Haptens, 0,202 mmol NHS und 0,223 mmol DCC wurden in 1 mL DMF angesetzt. Dieser Reaktionsansatz wurde 4 h bei RT gerührt, gefolgt von weiteren 12 h bei 4 °C (Kühlschrank). Danach wurde der Ansatz zentrifugiert (10 min bei 1400 upm), und der klare Überstand (aktivierter Ester) sehr langsam (20 µL/ 10 min) über mehrere Stunden zu der Proteinlösung (10 mg in 1 mL 0,05 M Boratpuffer, pH 8) hinzupipettiert. Dieses Gemisch wurde ca. 16 h (über Nacht) bei 4 °C (Kühlschrank) weitergerührt. Vor der Dialyse wurde der weiße Niederschlag, der sich bei der Zugabe des Haptens gebildet hatte, abzentrifugiert (10 min bei 1400 upm), um das Präzipitat (Harnstoff) zu entfernen. Die Dialyse erfolgte über 3 Tage in 0,2 M PBS, pH 7,6, mit zweimal täglichem Wechsel des Puffers.

Die Hapten-Protein-Konjugate DDT-Hapten-KLH, DDT-Hapten-OVA und DDT-Hapten-BSA wurden mit UV-Spektroskopie charakterisiert, um den Erfolg der Kopplung zu überprüfen (**Anhang, Teil C**).

### ***Methode B***

Das DDT-Hapten-OVA-Konjugat wurde auch mit reduziertem Ansatz von DDT-Hapten pro Protein unter denselben Bedingungen noch einmal konjugiert. An Stelle von 0,200 mmol von DDT-Hapten wurden nur 0,100 mmol (DDT-Hapten-OVA<sup>1/2</sup>) und 0,050 mmol (DDT-Hapten-OVA<sup>1/4</sup>) eingesetzt. NHS und DCC wurden dementsprechend reduziert, aber die Proteinkonzentration (10 mg/mL) wurde gleich behalten. Die weiteren Schritte der Konjugation wurden durchgeführt wie oben für den einfachen Ansatz beschrieben.

Bis zum Gebrauch wurden die Hapten-Protein-Konjugate ohne Zusätze bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

### **1.4.2 Synthese der Enzym Tracer-Konjugate**

Für den späteren Antikörpertest im Enzym Tracer-Format-ELISA wurden Kopplungen der DDT-Hapten an die Enzyme (POD und GOD) durchgeführt.

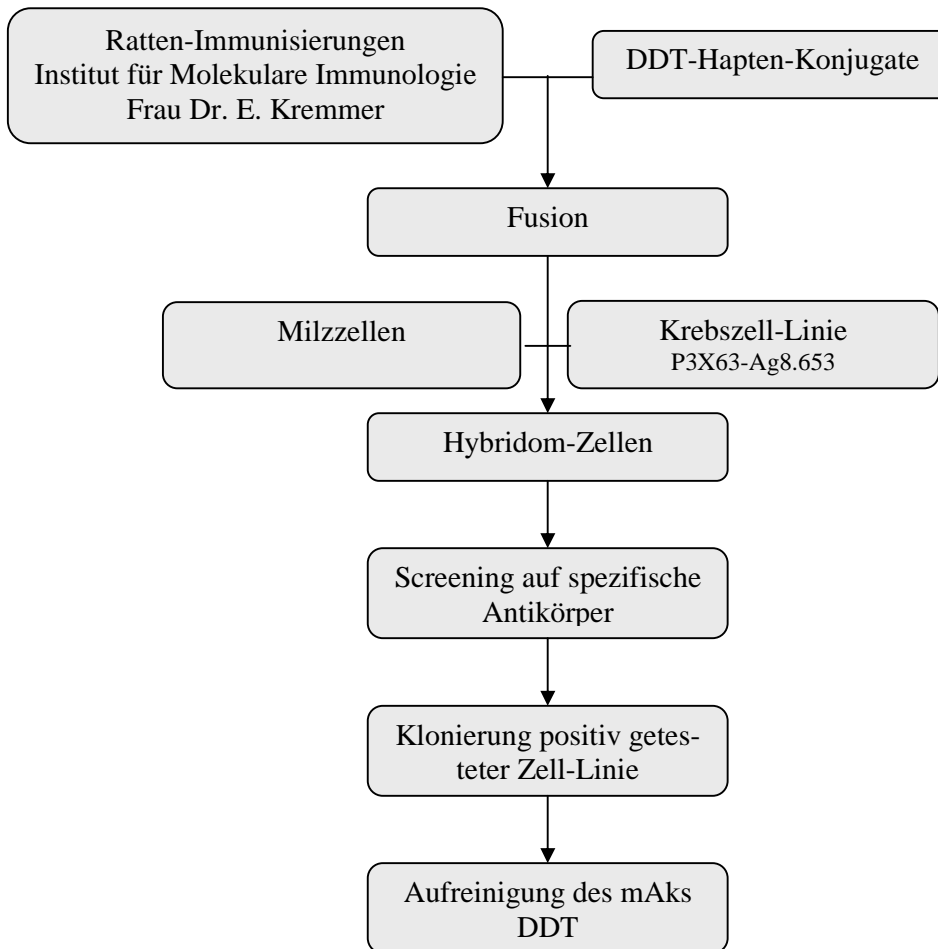
Die Herstellung der Enzym Tracer für DDT-Immunoassays erfolgte mit einer modifizierten Aktiv-Ester Methode von Schneider et al., 1994. Der Ablauf war wie folgt:

- 3 µmol des DDT-Haptens, 15 µmol NHS und 30 µmol DCC wurden in 130 µl DMF angesetzt. Dieser Reaktionsansatz wurde 12 h bei 4 °C (Kühlschrank) weiter gerührt, danach der Ansatz zentrifugiert (10 min/1400 upm) und der klare Überstand (aktivierter Ester) sehr langsam über mehrere Stunden (10 µL/10 min) zu der Enzymlösung (2 mg POD in 3 mL 0,13 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2; 2 mg GOD in 3 mL 0,13 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2, gelöst und 3 mg GOD in 3 mL 0,13 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2, gelöst) hinzupipettiert. Vor der Dialyse wurde der weiße Niederschlag, der sich bei der Zugabe des Haptens gebildet hatte, abzentrifugiert (10 min/1400 upm). Die Dialyse erfolgte über 3 Tage in 0,13 M NaHCO<sub>3</sub> Puffer, pH 8,2, mit zweimal täglichem Wechsel des Puffers.

Bis zum Gebrauch wurden die Enzym Tracer-Konjugate mit Zusätzen (50% Glycerol) für DDT-Hapten-HRP und ohne Zusätze für DDT-Hapten-GOD (2 mg und 3 mg) bei -27 °C im Gefrierschrank gelagert.

### 1.4.3 Screening der Klone

Für die Immunisierungen von Ratten wurden DDT-Hapten-KLH und DDT-Hapten-OVA als Immunogene eingesetzt. DDT-Hapten-BSA wurde für das Screening der Klone verwendet. Mehrere Injektionen der Konjugate wurden vom Institut für Molekulare Immunologie (IMI), GSF durchgeführt, **Abb. 9**.



**Abb. 9:** Herstellung von neuen anti-DDT mAbs

Es wurden zwei Ratten (LOU/C) mit ca. 50 µg vom DDT-Hapten-KLH-Konjugat und mit ca. 50 µg vom DDT-Hapten-OVA-Konjugat immunisiert (Injektion subcutan und intraperitoneal). Dazu wurde das jeweilige Immunogen mit Adjuvans (CPG2006; TIB MOLBIOL) versetzt und gut emulgiert. Im jeweiligen Abstand von zwei Wochen und drei Tagen vor der Fusion wurden die gleichen Antigenmengen erneut den Ratten intraperitoneal injiziert. Bei jeder Immunisierung wurde Blut entnommen, das zur Antikörpertiterbestimmung verwendet wurde. Die mAbs wurden mit der Hybridom-Technik nach Köhler & Milstein, 1975, vom IMI, München, hergestellt.

Die Fusion der Myeloma Zell-Linie P3X63-Ag8.653 mit Milzzellen von Ratten erfolgte mit einer Standardprozedur (Kremmer et al., 1995). Das Hybridom wurde mit DDT-Hapten-BSA-Konjugat im ELISA-Format getestet, um den spezifischen Antikörpertiter zu bestimmen. Das entsprechende Protein wurde als negative Kontrolle eingesetzt. Nur diejenigen Klone, die das Konjugat binden, wurden weiterverfolgt.

- 44 Kulturüberstände (mit den entsprechenden anti-DDT mAks) wurden nach den ersten Tests am IMI selektioniert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die 44 Kulturüberstände nochmals auf die Bindung in Coating Antigen- und Enzym Tracer-Formaten am Institut für Ökologische Chemie getestet.  
Für die Hemmung wurden *o,p'*-DDT und *p,p'*-DDT als Standards ausgewählt und in zweidimensionalen Titrationsen getestet. Die Kulturüberstände mussten dazu von 1:10 bis 1:1280 mit 40 mM PBS, pH 7,6-7,8, verdünnt werden, bevor sie auf der Mikrotiterplatte (MP) in Coating Antigen-Format getestet wurden. Von diesen Kulturüberständen wurden nur drei Überstände, die die beste Inhibition zeigten, ausgewählt: **DDT 7C12, DDT 1C1, DDT 1B2.**
- Die verschiedenen Immunglobuline und Subklassen der Antikörper wurden am IMI, GSF, München, unter Verwendung von biotinylierten mAks für IgM, IgG Subklassen und leichten-Ketten -IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -kappa, -IgM, -IgG2c und anti- bestimmt.
- Die mAks DDT 7C12 (IgG2a lambda), DDT 1C1 (IgG2b kappa) und DDT 1B2 (IgG2a, kappa) wurden in dieser Arbeit entwickelt und charakterisiert. Für die Charakterisierung mussten die anti-DDT mAks zunächst aus den Zellkulturüberständen aufgereinigt werden. Die Reinigung von neu entwickelten anti-DDT mAks wurde vom IMI, GSF (via Protein G-Sepharose 4 Fast Flow) durchgeführt und in 0,4% (v/v) Micro-O-protect bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

## 1.5 Entwicklung eines konventionellen ELISAs

Dieses Kapitel beschreibt die Entwicklung eines direkt und indirekt kompetitiven ELISAs für DDT in Mikrotiterplatten. Es wird sowohl auf die Herstellung von Coating Antigenen als auch auf die Enzym Tracer eingegangen.

Der konventionelle ELISA wurde in der MP in zwei unterschiedlichen Formaten durchgeführt: **Coating Antigen-Format** und **Enzym Tracer-Format.**

Die Optimierung des ELISAs erfolgte zuerst grundsätzlich durch die Variation von Coating Antigen-, Antikörper- und Tracerkonzentration in einer zweidimensionalen Titration. Geeignete Verdünnungen der Immunoreagenzien mussten für jeden Versuchsansatz festgelegt werden. Allgemein wurden Titrations in 1:2 Schritten durchgeführt. Konzentrationen und Inkubationszeiten des Coating Antigens, Antikörpers und Tracers wurden optimiert, um eine hohe Empfindlichkeit des Assays bei relativ hohen Signalintensitäten (ODs) zu erreichen. Der Testmittelpunkt ist ein Qualitätskriterium für den Assay. Er wird durch eine Reduzierung der Antikörper- und Tracerkonzentration bis zu einem bestimmten Punkt abgesenkt.

In manchen Optimierungen des ELISAs wurden Absättigungsschritte eingefügt. Blockreagenzien (Milchpulver, BSA) besetzen freie Oberflächen auf der MP. So konnten unspezifische Bindungen vermieden und dabei immer noch hohe ODs erreicht werden. Als Waschlösung wurde ein 0,05% (v/v) Tween enthaltene 4 mM PBS, pH 7,6-7,8, verwendet. Das Waschen der MP nach den einzelnen Inkubationsschritten wurde drei- bis viermal mit Hilfe eines 12- oder 8-Kanal-Waschkammes oder mit Mikrotiterplattenwasher durchgeführt (alle 96 Kavitäten gleichzeitig). Die Kavitäten wurden mit 300  $\mu$ L Waschlösung befüllt und die Platten durch Auskippen geleert.

Alle eingesetzten Lösungen und Proben wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt. Die MP wurden bei Raumtemperatur inkubiert, mit Ausnahme des Coatings auf MP, welches etwa 16 Stunden lang bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert wurde. Nach den letzten Waschsritten wurde die Enzym-Substrat-Reaktion durch Zugabe von TMB-Substratlösung gestartet und nach 10 bis 30 Minuten (je nach Farbentwicklung) durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt. Bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz 650 nm) wurden die MP photometrisch im ELISA-Reader gemessen.

Die optimierten ELISAs für DDT sind im folgenden dargestellt.



## **1.5.1 Coating Antigen-Format**

Als erster Schritt wurde ein ELISA im Coating Antigen-Format aufgebaut. Dieser ist wichtig für das Screening nach Klonen. Die neu entwickelten Immunoreagenzien eignen sich auch für die spätere Anwendung im Immunosensor.

### **1.5.1.1 Versuchsdurchführung**

In diesem Test-Format wurden zunächst die kommerziellen Immunoreagenzien (OVA-DDT 5 und mAk Lib 5-25) verwendet, **Tab. 3**.

Im folgenden Schritt wurden die hergestellten Coating Antigene (DDT-Hapten-KLH, DDT-Hapten-OVA, DDT-Hapten-BSA, DDT-Hapten-OVA $\frac{1}{2}$ , DDT-Hapten-OVA $\frac{1}{4}$ ), **Tab. 4**, und anti-DDT mAks (7C12, 1C1, 1B2) getestet und optimiert, **Tab. 5**.

**Tab. 3: Optimierte Testbedingungen für das Coating Antigen-Format**  
(indirekter kompetitiver ELISA) nach Abad et al., 1997

<b>Arbeitsschritte</b>	<b>Lösungen / Verdünnungen, die benötigt wurden</b>
<u>Coating</u>	<u>OVA-DDT 5 (Spanien)</u> 1 mg/mL, 1 µg/mL in 50 mM Carbonatpuffer, pH 9,8; 250 µl/Kavität, 4 °C, über Nacht (Kühlschrank)
<u>Waschen</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6
<u>Standard</u>	Konzentrationen 0,01-100.000 µg/L in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8; 2 h/RT Inkubation (zusammen mit Antikörper), unter Schütteln 100 µl/Kavität
<u>Antikörper</u>	<u>mAk Lib 5-25</u> (500 µg/mL) in 0,1% BSA/40 mM PBS, pH 7,6-7,8, 1: 2.000 (250 ng/mL) 100 µl/Kavität
<u>Waschen</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6
<u>Zweiter Antikörper</u>	<u>Ziege-anti-Maus-POD</u> , 1:50.000 in 40 mM PBST, pH 7,6-7,8 200 µl/Kavität, 1 h Inkubationszeit /RT
<u>Waschen</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6
<u>Substrat</u>	100 µL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 400 µL TMB in DMSO in 25 mL 100 mM Natriumacetatpuffer, pH 5,5 200 µl/Kavität, 20 min Inkubationszeit /RT, in Dunkelheit
<u>Waschen</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6
<u>Abstoppen</u>	2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50 µl/Kavität
<u>Detektion</u>	450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm)

**Tab. 4: Optimierte Testbedingungen für das Coating Antigen-Format**  
(indirekter kompetitiver ELISA) für mAk Lib 5-25 mit entwickelten Coating Antigenen

<b>Arbeitsschritte</b>	<b>Lösungen / Verdünnungen, die benötigt wurden</b>
<u>Coating</u>	<u>DDT-Hapten-KLH</u> (6,25 mg/mL), <u>DDT-Hapten-OVA</u> (6,58 mg/mL), <u>DDT-Hapten-BSA</u> (7,35 mg/mL), <u>DDT-Hapten-OVA<sup>1/2</sup></u> (4,5 mg/mL), <u>DDT-Hapten-OVA<sup>1/4</sup></u> (4,8 mg/mL, 9,7 mg/mL und 4,6 mg/mL), 2 µg/mL in 50 mM Carbonatpuffer, pH 9,8; 250 µl/Kavität, 4 °C, über Nacht (Kühlschrank)
<u>Waschen Standard</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6 Konzentrationen 0,01-100.000 µg/L in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8; 2 h Inkubation/RT (zusammen mit Antikörper), unter Schütteln 100 µl/Kavität
<u>Antikörper</u>	<u>mAk Lib 5-25</u> (500 µg/mL), in 0,1% BSA/40 mM PBS, pH 7,6-7,8; 1: 2.000 (250 ng/mL); 100 µl/Kavität
<u>Waschen Zweiter Antikörper</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6 <u>Ziege-anti-Maus-POD</u> , 1:50.000 in 40 mM PBST, pH 7,6-7,8 200 µl/Kavität/1 h Inkubation/RT
<u>Waschen Substrat</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6 100 µL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 400 µL TMB in DMSO in 25 mL 100 mM Natriumacetatpuffer, pH 5,5 200 µl/Kavität für 10/15 min Inkubation/RT, in Dunkelheit
<u>Waschen Abstoppen Detektion</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6 2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50 µl/Kavität 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm)

**Tab. 5: Optimierte Testbedingungen für das Coating Antigen-Format**  
(indirekter kompetitiver ELISA) für entwickelte Immunoreagenzien

<b>Arbeitsschritte</b>	<b>Lösungen / Verdünnungen, die benötigt wurden</b>
<u>Coating</u>	DDT-Hapten -OVA <sup>1/2</sup> (4,5 mg/mL), DDT-Hapten OVA <sup>1/4</sup> (4,8 mg/mL, 9,7 mg/mL und 4,6 mg/mL), 0,5 µg/mL für mAk DDT 1C1 und 1 µg/mL für mAk DDT 7C12 und für mAk DDT 1B2 in 50 mM Carbonatpuffer, pH 9,8; 250 µl/Kavität, 4 °C, über Nacht (Kühlschrank)
<u>Waschen</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6
<u>Absättigung</u>	1% (w/v) Milchpulver in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8, für mAk DDT 7C12 und für mAk DDT 1B2 270 µl/Kavität für 1h/RT nicht notwendig für mAk DDT 1C1
<u>Waschen</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6
<u>Standard bzw. Probe (Realprobe, Sediment-Extrakt)</u>	Konzentrationen 0,01 – 100.000 µg/L in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 100 µl/Kavität, 2 h Inkubation/RT (zusammen mit Antikörper), unter Schütteln
<u>Antikörper</u>	<u>mAk DDT 1C1</u> (0,6 mg/mL oder 1,2 mg/mL, 250 ng/mL), in 0,1 % BSA in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 <u>mAk DDT 7C12</u> (6 mg/mL, 125 ng/mL), in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 <u>mAk DDT 1B2</u> (1,3 mg/mL, 500 ng/mL), in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 100 µl/Kavität
<u>Waschen</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6
<u>Zweiter Antikörper</u>	<u>Ziege-anti-Rat-POD</u> , 1:20.000 (1:1 in Glycerol) in 40 mM PBST, pH 7,6-7,8 200 µl/Kavität für 1h Inkubation/RT
<u>Substrat</u>	100 µL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 400 µL TMB in DMSO in 25 mL 100 mM Natriumacetatpuffer, pH 5,5 200 µl/Kavität für 10/15 min Inkubation/RT, in Dunkelheit
<u>Waschen</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6
<u>Abstoppen</u>	2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50 µl/Kavität
<u>Detektion</u>	450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm)

## 1.5.2 Enzym Tracer-Format

### 1.5.2.1 Versuchsdurchführung

Das DDT-Hapten wurde an zwei Enzyme kovalent gekoppelt, nämlich HRP und GOD. Verschiedene Verdünnungen von DDT-Hapten-Enzym-Konjugaten (DDT-Hapten-HRP, **Tab. 6**, und DDT-Hapten-GOD, **Tab. 7**), mit mAk Lib 5-25 und neu entwickelte anti-DDT mAks wurden im Enzym Tracer-Format optimiert.

**Tab. 6: Optimierte Testbedingungen für das Enzym Tracer-Format**  
(direkter kompetitiver ELISA), mit DDT-Hapten-HRP

<u>Arbeitsschritte</u>	<u>Lösungen / Verdünnungen, die benötigt wurden</u>
<u>Coating</u>	<u>Maus-anti-Ratte kappa TIB-172</u> , für mAk DDT 1C1 und mAk DDT 1B2; 1 µg/mL oder 2 µg/mL <u>Maus-anti-Ratte lambda LA 1B12</u> für mAk DDT 7C12; 2 µg/mL <u>Ziege-anti-Maus</u> für mAk Lib 5-25 2,4 µg/mL und/oder verschiedene Proteine (A, G, A/G) 2 µg/mL in 50 mM Carbonatpuffer, pH 9,8 200 µL/Kavität, 4 °C, über Nacht (Kühlschrank)
<u>Waschen</u> <u>Antikörper</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6 <u>mAk DDT 1C1</u> (0,6 mg/mL oder 1,2 mg/mL; 300 ng/mL), <u>mAk DDT 7C12</u> (6 mg/mL; 125 ng/mL) und <u>mAk DDT 1B2</u> (1,3 mg/mL; 250 ng/mL) in 1 % (w/v) Milchpulver in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 <u>mAk Lib 5-25</u> (1:1.000) in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 150 µL/Kavität, Inkubationszeit 2h/RT
<u>Waschen</u> <u>Standard bzw. Probe (Realprobe, Sediment-Extrakt)</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6 Konzentrationen 0,01-10.0000 µg/L in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 100 µL/Kavität für 1h Inkubation/RT
<u>Enzym Tracer</u>	<u>DDT-Hapten-HRP</u> (1:8.000 für mAk DDT 1C1, mAk DDT 7C12 und 1:1.000 für mAk DDT 1B2), mAk Lib 5-25 (1:4.000) in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 50 µL/ Kavität für 30 min Inkubation/RT, unter Schütteln
<u>Waschen</u> <u>Substrat</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6 100 µL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 400 µL TMB in DMSO in 25 mL 100 mM Natriumacetatpuffer, pH 5,5 200 µL/Kavität für 20 min Inkubation/RT in Dunkelheit
<u>Waschen</u> <u>Abstoppen</u> <u>Detektion</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6 2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50 µL/Kavität 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm)

**Tab. 7: Optimierte Testbedingungen für das Enzym Tracer-Format**  
(direkter kompetitiver ELISA) mit DDT-Hapten-GOD (2 mg und 3 mg)

<b>Arbeitsschritte</b>	<b>Lösungen / Verdünnungen, die benötigt wurden</b>
<u>Coating</u>	<u>Maus-anti-Ratte kappa TIB-172</u> , für mAk DDT 1C1 und mAk DDT 1B2; 1 µg/mL oder 2 µg/mL <u>Maus-anti-Ratte lambda LA 1B12</u> für mAk DDT 7C12, und/oder verschiedene Proteine (A, G, A/G, 2 µg/mL) <u>Ziege-anti-Maus</u> für mAk Lib 5-25 2,4 µg/mL in 50 mM Carbonatpuffer, pH 9,8 200 µl/Kavität, 4 °C, über Nacht (Kühlschrank)
<u>Waschen</u> <u>Antikörper</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6 <u>mAk DDT 1C1</u> (0,6 mg/mL oder 1,2 mg/mL; 500 ng/mL oder 600 ng/mL) <u>mAk DDT 7C12</u> (6 mg/mL; 300 ng/mL) <u>mAk DDT 1B2</u> (1,3 mg/mL; 1.000 ng/mL) in 1% (w/v) Milchpulver in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 <u>mAk Lib 5-25</u> (1:1.000) in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 150 µL/Kavität, für 2 h Inkubation/RT
<u>Waschen</u> <u>Standard bzw. Probe (Realprobe, Sediment-Extrakt)</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6 Konzentrationen 0,01-100000 µg/L in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 100 µl/Kavität für 1 h Inkubation/RT
<u>Enzym Tracer</u>	<u>DDT-Hapten-GOD</u> (2 mg und 3 mg), (1:1.000 für mAk DDT 1C1, mAk DDT 7C12 und für mAk DDT 1B2), mAk Lib 5-25 (1:2.000) in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 50 µL/Kavität für 30 min Inkubation/RT, unter Schütteln in Dunkelheit
<u>Waschen</u> <u>Substrat</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6 D(+) Glucose /100 µL HRP/100 µL TMB in DMSO in 25 mL 100 mM Natriumacetatpuffer, pH 5,5 150 µl/Kavität für 30 min Inkubation/RT, unter Schütteln in Dunkelheit
<u>Waschen</u> <u>Abstoppen</u> <u>Detektion</u>	3-mal mit 4 mM PBST, pH 7,6 2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50 µl/Kavität 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm)

Die optimierten Testbedingungen in beiden ELISA-Formaten wurden weiter für die Charakterisierungen des ELISAs im Coating Antigen-Format und im Enzym Tracer-Format (Bestimmung von Kreuzreaktivitäten und Lösungsmittelverträglichkeit) eingesetzt.

## 1.6 Charakterisierung der Antikörper

### 1.6.1 Bestimmung von Kreuzreaktivitäten

Die Fähigkeit des Antikörpers, auch andere Strukturen als den Hauptanalyten zu erkennen, nennt man Kreuzreaktivität. Je selektiver ein Antikörper ist, desto weniger Kreuzreaktionen weist er auf.

Zur Charakterisierung der Selektivität von anti-DDT mAks im Coating Antigen-Format und Enzym Tracer-Format wurden die Kreuzreaktionen von DDT-Isomeren und DDT-Metaboliten (*p,p'*-DDE, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDD und *p,p'*-DDA) bestimmt. Außerdem wurde auch das DDT-Hapten auf Kreuzreaktivität getestet. Die Testmittelpunkte der einzelnen Substanzen wurden mit denen von *p,p'*-DDT mit mAk DDT 7C12, mAk DDT 1B2 und *o,p'*-DDT mit mAk DDT 1C1 verglichen.

Mittels der Testmittelpunkte bei der Detektion verschiedener DDT-Metaboliten wurde die Kreuzreaktivität in Prozent berechnet:

$$\text{CR} = 100 \times \text{IC } 50\% (\textit{p,p'}\text{-DDT oder } \textit{o,p'}\text{-DDT}) / \text{IC } 50\% (\text{Testsubstanz})$$

CR: Kreuzreaktivität [%]

IC 50% (*p,p'*-DDT oder *o,p'*-DDT): Testmittelpunkt des Standards [ $\mu\text{g/L}$ ]

IC 50% (Testsubstanz): Testmittelpunkt der Testsubstanz [ $\mu\text{g/L}$ ]

### 1.6.2 Lösungsmittelverträglichkeit

Lösungsmittelleffekte im ELISA sind hinsichtlich eines vorausgehenden Flüssigextrakt-schrittes für Nairobi-Fluss-Sedimente sowie der Auswahl des Lösungsmittels für die Tests von Realwasserproben in ELISA und AQUA-OPTOSENSOR von Bedeutung. Auf diese Weise wurde die Verträglichkeit der anti-DDT mAks von verschiedenen Lösungsmitteln (MeOH, EtOH, Aceton, Isopropanol, ACN, n-Hexan) optimiert. Die folgenden Konzentrationen wurden getestet: 0, 5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 und 40% (in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 verdünnt). Zusätzlich wurden Optimierungen auch mit Zusatz von DMF, Tween, DMSO und Low Cross Buffer in den folgenden Konzentrationen getestet: 0,001, 0,01, 1 und 10% (in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8, verdünnt).

Für die weiteren Optimierungen von Standardkurven in ELISA mit mAk DDT 1C1 wurde *o,p'*-DDT in 10% Isopropanol mit DMSO in 4:1 Verdünnung und 0,001% Tween angesetzt. Der Einfluss auf Immunoassays mit *o,p'*-DDT in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8, oder 10% Isopropanol wurde direkt oder nach 2 Stunden Inkubationszeit beobachtet. Durch den Einsatz von Lösungsmitteln wurde die Bindung von DDT an den Glasoberflächen von Schnappgläsern vermieden (bzw. reduziert).

### **1.7 Probennahme und Messung von Wasserproben**

Es wurden jeweils drei verschiedene Fluss- und Seewasserproben aus München und elf aus dem Nairobi-Fluss in Kenia in den ELISA-Formaten getestet.

Die Wasserproben wurden in München vom Riemer See, aus der Isar und einem Bach im Englischen Garten im August 2005 entnommen und bis zur Analyse unter Kühlung (4 °C) in braunen Glasflaschen (1L) aufbewahrt. Für die Messung von Wasserproben wurden die bereits beschriebenen Testdurchführungen der optimierten ELISA-Formate verwendet. Die Wasserproben wurden mit verschiedenen Konzentrationen von 1, 2, 3, 5, 10, und 50 µg/L dotiert und dann direkt für den ELISA im Coating Antigen-Format mit mAk DDT 7C12 getestet. Die Standardkurve für *p,p'*-DDT wurde in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8, angesetzt.

Die Proben vom Nairobi-Fluss in Kenia ( Ondire lower“, Ondire upper“, Nyongara lower“, Loretto“, Kirichwa“, Chiromo“, Museum“, Globe Roundabout“, Racecourse“, Shauri Moyo“, Outer Ring Road“) wurden im September 2005 entnommen und getestet. Diese Proben wurden im Oktober 2005 in München noch einmal getestet. Bis zur Analyse wurden sie unter Kühlung (4 °C) in Gläsern aufbewahrt. Die Wasserproben vom Nairobi-Fluss wurden in verschiedenen Konzentrationen von 0,1, 0,5, 1, 5, und 10 µg/L dotiert und dann direkt für den ELISA im Coating Antigen-Format und Enzym Tracer-Format mit mAk DDT 7C12 und mAk DDT 1B2 getestet. Die Standardkurve für *p,p'*-DDT wurde in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8, angesetzt.

### **1.8 Probennahme und Messung von Sedimenten**

Die Sedimentproben wurden an der Oberfläche (1-4 cm) in Aluminiumfolie vom Nairobi-Fluss in Kenia ( Ondire upper“, Museum“ und Outer Ring Road“) entnommen und dann bis zur Verarbeitung in Gläsern abgefüllt. Bis zu weiteren Probenaufbereitungen wurden die Sedimentproben im Gefrierschrank (-27 °C) aufbewahrt.



Die ELISA-Durchführungen im Coating Antigen- und Enzym Tracer-Format mit den neu entwickelten mAKs (DDT 1C1; DDT 7C12 und DDT 1B2) sind in **Tabellen 4-7**, detailliert beschrieben.

Für den ELISA im Coating Antigen-Format wurden die Sediment-Extrakte 1:25, 1:50 und 1:100 in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 verdünnt, und die Standardkurven wurden in 4% Isopropanol/40 mM PBS, pH 7,6-7,8, bzw. 2% Isopropanol/40 mM PBS, pH 7,6-7,8, angesetzt.

Für den ELISA im Enzym Tracer-Format mit DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD wurden die Sediment-Extrakte 1:50 und 1:100 in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8, verdünnt und die Standardkurven in 2% Isopropanol/40 mM PBS, pH 7,6-7,8, bzw. 1% Isopropanol/40 mM PBS, pH 7,6-7,8, angesetzt.

## 1.9 Auswertung der Messdaten

Die quantitative Auswertung von ELISA-Daten erfolgte mittels sigmoidaler Kalibrierkurven, die durch Auftragung der Absorptionswerte über den zugehörigen logarithmierten Standardkonzentrationen erstellt wurden. Die Farbintensität des Produktes ist indirekt proportional zur Analytkonzentration. Die Standardkurven wurden unter Verwendung von 4-Parametergleichung in SOFTmax<sup>®</sup> Pro mit der Formel ausgewertet:

$$y = \frac{(A-D)}{(1+(x/C)^B)} + D$$

y: Absorption

A: Maximale Absorption (obere Asymptote)

D: Minimale Absorption (untere Asymptote)

x: Analytkonzentration in µg/L

C: Testmittelpunkt (IC 50%) in µg/L

B: Steigung am Testmittelpunkt

Der Testmittelpunkt (IC 50%) oder Wendepunkt der sigmoiden Kurve ist die Analytkonzentration bei 50% Inhibition. Dabei wurden die Messwerte als Mittelwerte ± Standardabweichung in SOFTmax<sup>®</sup> Pro ausgewertet.

Für die zweidimensionalen Titrationsen wurden die Auswertungen in MS-Excel und die Messwerte als Mittelwerte ± Standardabweichung ausgewertet.

Da die Absorptionswerte aufgrund der experimentellen Bedingungen (Temperatur, Zeitdauer der Enzym-Substrat-Reaktion, Konzentration des Tracers etc.) schwanken können, wurden sie in % Control ausgewertet:

$$\text{Control (\%)} = (A/A_0) \times 100$$

A: Absorption eines Standards

A<sub>0</sub>: Absorption von Nullstandard (0 µg/L; 40 mM PBS, pH 7,6-7,8)

## 2 Immunosensoren

### 2.1 Allgemeine Materialien und Arbeitsgeräte

- Dialyse Kassetten, 0,1-0,5 mL und 0,5-3 mL, Pierce Dialyse Cassette Slide-A-Lyzer™, 10000 Extra-Strength.
- Pipette einstellbar für 0,1-2,5 µl, Multipipetten® plus einstellbar, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland.

### 2.2 Antikörper

- anti-DDT mAks: **DDT 7C12** (IgG2a lambda), **DDT 1C1** (IgG2b kappa) und **DDT 1B2** (IgG2a, kappa), die in dieser Arbeit im ELISA-Format entwickelt und charakterisiert wurden.

### 2.3 Synthese der mAks DDT Oyster®-645-Konjugate

Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion im Immunosensor wurden die anti-DDT mAks mit einem Marker, dem Fluoreszenzfarbstoff Oyster®-645, konjugiert. Dieser Farbstoff ist dem Cy5™ ähnlich, aber zwei- bis dreimal heller als der Cyanin-farbstoff.

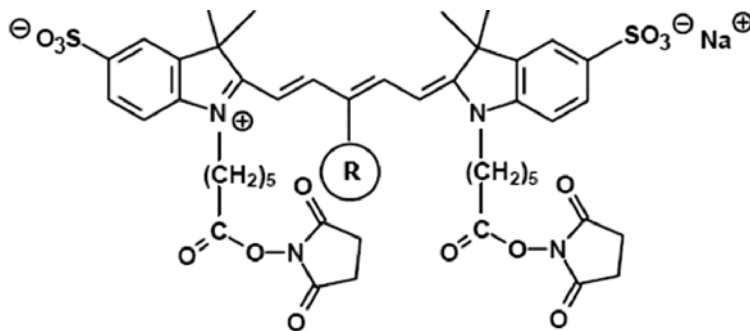
#### *Dialyse der Antikörper und Kopplung des Oyster®-645-Farbstoffes*

Um die mAks DDT Oyster®-645-Konjugate herzustellen, wurden zunächst die anti-DDT mAks mit folgenden Konzentrationen dialysiert:

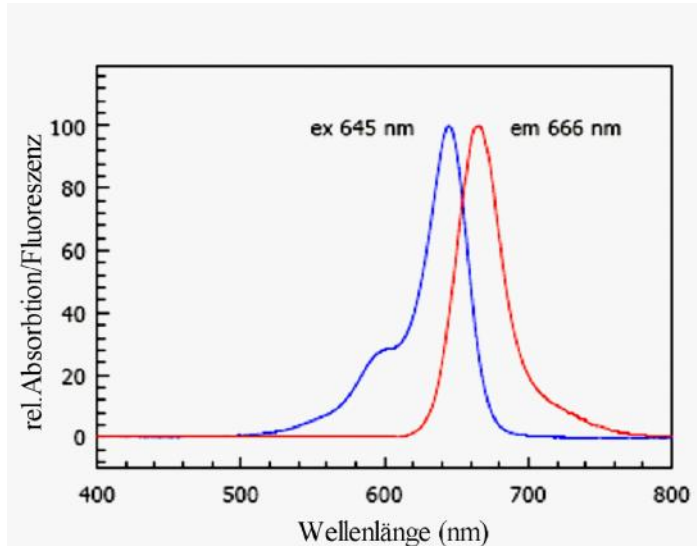
- DDT 7C12 mit 6 mg/mL,
- DDT 1C1 mit 0,6 mg/mL, 1 mg/mL, 1,2 mg/mL und 1,8 mg/mL,
- DDT 1B2 mit 1,3 mg/mL.

Da die Antikörper in verschiedenen Lösungen gelagert wurden (Tris; Micro-O-Protect 0,4% oder 1% (v/v) und Azid 0,1% (v/v)) ist eine Dialyse vor der anti-DDT mAks Konjugation notwendig.

Es wurden zwischen 100-500  $\mu\text{L}$  mAks DDT über Nacht bei 4 °C (Kühlschrank) gegen 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, dialysiert. Die Menge an mAks wurde an die Menge, die man mit dem Farbstoff konjugieren kann, angepasst. Am nächsten Tag wurden die mAks DDT (1B2 1 mg/mL, 1,5 mg/mL; 7C12 1,5 mg/mL; 1C1 0,6 mg/mL und/oder 0,9 mg/mL) an Oyster-645-NHS (**Abb. 10**) konjugiert.



(A)



(B)

**Abb. 10: Fluoreszenzfarbstoff-Oyster<sup>®</sup>-645-Denovo Biolabels GmbH, Münster, Deutschland**

(A) Struktur des Fluoreszenzfarbstoffs

(B) Absorptions- und Fluoreszenzspektren

Die Wellenlängenbereiche sind nach Information des Herstellers wie folgt bestimmt:  $\text{ex } 645 \text{ nm}$ ,  $\text{em } 666 \text{ nm}$ ; Protein-Konjugat:  $\text{ex } 650 \text{ nm}$ ,  $\text{em } 669 \text{ nm}$

## ***Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese der anti-DDT mAks Oyster<sup>®</sup>-645-Konjugate***

Der blaue Fluoreszenzfarbstoff (1 Flakon reicht zur Konjugation von 1,5 mg Antikörper) wurde mit 20  $\mu$ L DMF gelöst und zur Antikörper-Lösung unter langsamem Rühren in Dunkelheit gegeben.

Für die Verbesserung der Sensitivität im Testformat wurden die Konzentration von Oyster<sup>®</sup>-645 für jeden Antikörper zu  $\frac{1}{4}$  reduziert und, um ein möglichst sensitives Testformat zu erstellen, für die Herstellung der mit Oyster<sup>®</sup>-645 markierten Antikörper verschiedene Abstoppszeiten überprüft.

Die Mischung wurde bei RT unter ständigem Rühren zwischen 5-20 min inkubiert und die Reaktion (NHS-Ester) anschließend mit 2  $\mu$ L 10% (w/v) Glycin in 10 mM Phosphatpuffer pro 100  $\mu$ L anti-DDT mAks geblockt.

Dann wurden die Konjugate über Nacht bei 4 °C (Kühlschrank) gegen 10 mM Phosphatpuffer pH 7,6-7,8 mit zweimaligem Wechsel des Puffers in Slide-A-Lyser™ dialysiert.

Die anti-DDT mAks Oyster<sup>®</sup>-Konjugate mit Konzentrationen von 1,5 mg/mL oder 0,7 mg/mL für DDT 7C12 Oyster<sup>®</sup>-645; 1,3 mg/mL oder 0,8 mg/mL für DDT 1B2-Oyster<sup>®</sup>-645 und 0,6 mg/mL für DDT 1C1 Oyster<sup>®</sup>-645 wurden eingesetzt und im AQUA-OPTOSENSOR getestet.

Als Vorversuch wurde die Aktivität der mAks DDT Oyster<sup>®</sup>-Konjugate überprüft. Dazu wurde der entsprechende ELISA im Coating Antigen-Format, wie in Kap. 1.5.1.1, **Tab. 5**, detailliert beschrieben, eingesetzt. Die Titrations der anti-DDT mAks Oyster<sup>®</sup>-Konjugate wurden in 1:2 Schritten in einer zweidimensionalen Titration durchgeführt.

## **2.4 AQUA-OPTOSENSOR**

Der AQUA-OPTOSENSOR, **Abb. 11** (Maße 320x260x135 mm; Gewicht 3,3 kg), ist ein Gerät, welches auf dem IOS-System aufgebaut wurde. Details zum IOS-System sind bei Meusel et al., 1998, beschrieben.

Das Gerät besteht aus drei Komponenten: dem Messgerät, **Abb. 11 (A)** (Siemens AG, München, Deutschland), dem eigentlichen Sensor-Chip (Einweg-Chip) (pes Diagnose-systeme GmbH, Leipzig, Deutschland), **Abb. 11 (B)/(C)**, und einem Laptop zur Ansteuerung und Aufnahme der Daten (nicht im Bild gezeigt). Der Sensor-Chip besteht aus einem Prisma (Polymethylmethacrylat, PMMA, 11 mm x 23 mm, **Abb. 11 (B)**), an dessen Unterseite der Einweg-Chip mit einem Klebestreifen befestigt ist. Dieser

Klebestreifen definiert auch den Mikrokanal, 50  $\mu\text{m}$ , durch den die Flüssigkeit transportiert wird.

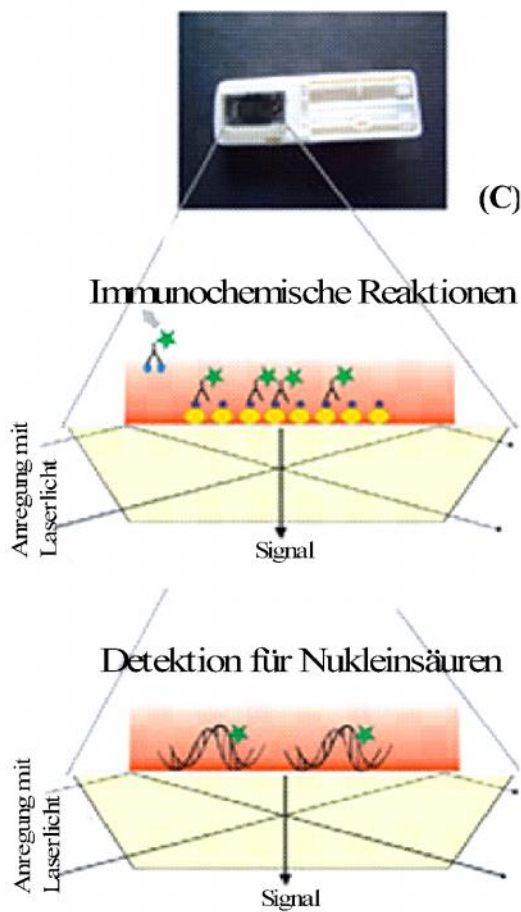
Auf dem Einweg-Chip befindet sich das Coating-Antigen. Die anti-DDT mAKs, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Oyster<sup>®</sup>-645, Denovo biolabels, Münster) markiert sind, wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von DDT (0,01 – 1.000  $\mu\text{g/L}$ ) inkubiert und danach wurde das Gemisch über die Sensor-Chipoberfläche mit Coating Antigen gepumpt (2 min). Die noch freien Bindungsstellen der mAKs binden am Coating Antigen auf der Oberfläche des Sensor-Chips und die Fluoreszenz des Fluoreszenzmarkers am Antikörper wird im Fluoreszenzdetektor gemessen (Nutzung des evaneszenten Feldes). Die Ausbreitung des Lichtes erfolgt durch Totalreflexion an den Grenzflächen eines Lichtleiters. Die Fluoreszenz des mit Oyster markierten Antikörpers wird über eine Anregung mit Laserlicht im evaneszenten Feld detektiert.



(A)



(B)



**Abb. 11:** AQUA-OPTOSENSOR mit:

- (A) Instrument mit offener Klappe
- (B) Sensor-Chip (Einweg-Chip) von der Seite
- (C) Sensor-Chip (Einweg-Chip) von unten

(Quelle: Rauch, Deutsches Biosensor Symposium, Regensburg, 13.-16. März 2005)

Das System kann für immunochemische Reaktionen und auch zur Detektion von Nukleinsäuren eingesetzt werden. Dieses System wird genutzt zur Detektion von pathogenen Mikroorganismen.

## 2.5 Übertragung der Immunoreagenzien auf den Immunosensor

In dieser Arbeit wurden die Vorversuche zur Messung von DDT im ELISA-Format durchgeführt. Bei späteren Messungen von DDT wurde ein Immunosensor (AQUA-OPTOSENSOR) verwendet. Zur Übertragung der Immunoreagenzien auf den Immunosensor, Immobilisierung, Optimierung und Charakterisierung des Immunosensors wurde der ELISA im Coating Antigen-Format ausgewählt.

### 2.5.1 Versuchsaufbau mit AQUA-OPTOSENSOR

#### *Messprinzip*

Die Lösung wird in die Sensorkammer pipettiert. Die Kolben steuern die Pumpe im Inneren des Sensors und pressen die Luft aus der Kolbenkammer, indem der Kolben vollständig in den Sensor geschoben wird. Die Flüssigkeit wird aus der Sensorkammer in die Kolbenkammer gepumpt. Für die Messung muss die Ventilsteuerung so positioniert sein, dass die Lösung von der Kolbenkammer auf das Prisma gepumpt werden kann. Die Lösung wird mit einer definierten Geschwindigkeit über das Prisma in die Abfallkammer gepumpt.

Während die Flüssigkeit über das Prisma gepumpt wird, verändert sich die Detektionsposition in bestimmten Zeitintervallen von Position zu Position in einem bestimmten Scanbereich mit einstellbaren Anfangs- und Endpositionen.

Ein Laserstrahl wird über das Prisma geführt, dadurch werden an den Reflexionsstellen gebundene fluoreszenzmarkierte Antikörper angeregt.

Das Fluoreszenzlicht, das an den Reflexionspunkten im evaneszenten Feld entsteht, wird optisch zur Oberfläche eingesammelt und mit einem Photomultiplier detektiert. Diese Technologie, die das evaneszente Feld nutzt, wurde bei Schult et al., 1999, beschrieben.

Die Kombination von Fluoreszenzmessungen und evaneszentelem Feld liefert sensitive Detektionen und vermeidet Wasch- oder Trennungsschritte.

Nachdem die Endposition erreicht ist, kehrt der Kolben innerhalb von einer Sekunde wieder in seine Anfangsposition zurück. Zeitabhängige Seriencans werden während des oben beschriebenen Prozesses gemessen.

Nach zwei Minuten ist die komplette Messung beendet, die Messsignale werden verarbeitet und über einen Laptop via Software AQUA-OPTOSENSOR, version 1.00 (Siemens AG, München, Deutschland), **Abb. 12**, ausgegeben.



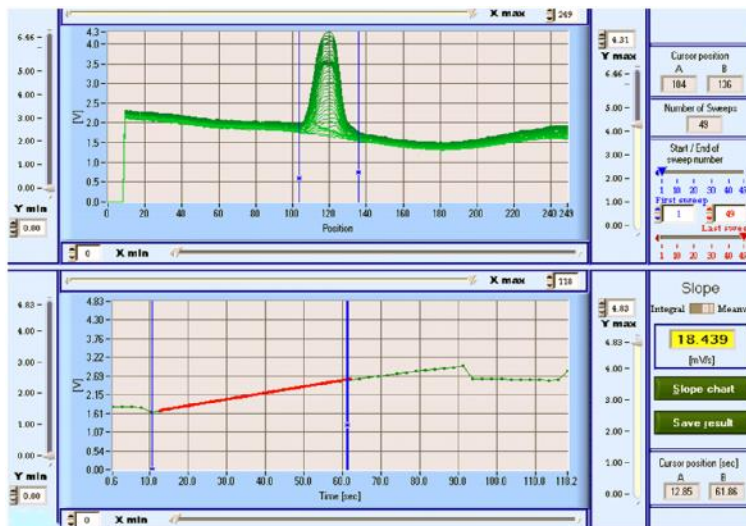
**Abb. 12:** Programmstart AQUA-OPTOSENSOR, version 1.00  
(Siemens AG, München, Deutschland)

Das Signal [mV/s], wie in ELISA, ist umgekehrt proportional zur Standardkonzentration. Für die Auswertung der Messungen wird die maximale Anzeige des Peaks vom linearen Bereich [mV/s] festgelegt. Deshalb müssen die Cursor in den Positionieranzeigen A und B am Anfang und am Ende des Peaks eingestellt werden. Die anderen Cursor-Positionen [sec] A und B bestimmen die maximale Zeit, in welcher die Steigung linear ist, **Abb. 13**. Von Messung zu Messung müssen die Cursor auf die gleichen Positionen eingestellt werden, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.

Die Lösung wird nach Messende in die Abfallkammer gepumpt und die Kolben aus dem Sensor-Chip gezogen. Die Ventilsteuerung wird in die Ausgangsposition zurückgesetzt und der Sensor-Chip entnommen.

Das ganze System ist temperaturkontrolliert auf 35,5 °C eingestellt.





**Abb. 13: AQUA-OPTOSENSOR - Auswertung der Messungen:**  
Peak (Slope 18,439 [mV/s]) mit Cursor-Positionen A/B (104-136) und Cursor-Positionen [sec] A/B für die Bestimmung der maximalen Zeit (12,85-61,86)

### 2.5.1.1 Optimierungen der Immunoreagenzien und Durchführung der Messungen

Zuerst wurden die DDT-Hapten-Konjugate-KLH, -OVA, -BSA in verschiedenen Verdünnungsreihen getestet. Für die Verdünnung der Konjugate wurde 10 mM Phosphatpuffer pH 7,6-7,8 in 1:2 Verdünnungsschritten verwendet.

Als am besten geeignetes Hapten-Protein-Konjugat für DDT-Untersuchungen mit dem AQUA-OPTOSENSOR wurde das DDT-Hapten-KLH-Konjugat (3,1 mg/mL/0,1  $\mu$ L auf das Prisma) für die Tests eingesetzt.

Im Laufe der Arbeit wurden verschiedene Optimierungen des Testablaufs wie z.B die Inkubationszeiten für die Immunoreagenzien und Lösungsmittelverträglichkeiten notwendig. Eine wichtige Rolle spielte der Einsatz einer kleinen Menge von 0,1  $\mu$ L von Coating Antigen, die auf das Prisma pipettiert wurde. Die Größe dieser Spots beeinflusst die Gleichmäßigkeit und Reproduzierbarkeit des Peaks auf spätere Messungen. Da die anti-DDT mAbs Oyster<sup>®</sup>-645-Konjugate unspezifisch an der Oberfläche des Prismas binden können, wurde für die weiteren Optimierungen der Einsatz von verschiedenen Absättigungslösungen notwendig. Die Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen (w/v) von Milchpulver, OVA, BSA und Low Cross Buffer angesetzt. Als beste Absättigungsmöglichkeit hat sich 2% BSA für die Antikörperverdünnungen herausgestellt.

Auf der Oberfläche des PMMA-Prismas wurde das Coating Antigen immobilisiert und nach dem Antrocknen mit Hilfe eines Klebestreifens auf den Sensor fixiert und gepresst. Hierzu wurde eine eigens hergestellte Presse verwendet (**Abb. 14**).



**Abb. 14: Presse**

Die optimierten anti-DDT mAk Oyster<sup>®</sup>-645-Konjugate (7C12-Oyster<sup>®</sup>-645 (2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 1B2-Oyster<sup>®</sup>-645 (4,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 1C1-Oyster<sup>®</sup>-645 (1,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )) in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 mit 2% (w/v) BSA wurden mit den Standards (*p,p'*-DDT oder *o,p'*-DDT in 5% (v/v) Isopropanol in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8) inkubiert (150  $\mu\text{L}$  mAks mit 150  $\mu\text{L}$  Standards/30 min).

Die Standards und anti-DDT mAk DDT Oyster<sup>®</sup>-645-Konjugate wurden in Braungläschen mit Verschluss in Dunkelheit und unter Schütteln inkubiert. Für die Messungen wurde die Flüssigkeit mit Hilfe einer 200  $\mu\text{L}$ -Pipette oder einer Insulinspritze in eine kleine Öffnung des Sensorgehäuses pipettiert. Das Gemisch wurde nach der Inkubationszeit über die Oberfläche mit Coating Antigen gepumpt (2 min).

### 2.5.1.1.1 Messung von Realwasserproben

Die Probennahmen vom Riemer See, aus der Isar, einem Bach im Englischen Garten und vom Nairobi-Fluss in Kenia erfolgten wie bereits in 1.7 beschrieben.

Die Wasserproben wurden mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,1 und 33,33 µg/L dotiert und dann mit AQUA-OPTOSENSOR unter Anwendung von anti-DDT mAk Oyster<sup>®</sup>-645-Konjugaten (DDT 1C1-Oyster<sup>®</sup>-645, DDT 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645 und DDT 1B2-Oyster<sup>®</sup>-645) gemessen. Die Standardkurve für *p,p'*-DDT und *o,p'*-DDT wurde in 5% (v/v) Isopropanol in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 angesetzt.

### 2.5.1.1.2 Messung von Sedimenten

Die Entnahme der Sedimentproben vom Nairobi-Fluss in Kenia erfolgte wie in 1.8 bereits beschrieben.

Für den Test wurden die Sedimentextrakte 1:50 in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8, verdünnt. 500 µL mAk DDT 1B2-Oyster<sup>®</sup>-645 (0,8 mg/mL), 1,5 µg/mL in 2% BSA/40 mM PBS, pH 7,6-7,8 wurde mit 500 µL Sedimentextrakten 1:50 für 30 min in Dunkelheit unter Schütteln inkubiert. Es wurden drei bis fünf Bestimmungen pro Sediment gemessen. Für die Standardkurven wurden 150 µL mAk DDT 1B2-Oyster<sup>®</sup>-645 (0,8 mg/mL), 1,5 µg/mL in 2% BSA/40 mM PBS, pH 7,6-7,8 mit 150 µL Sedimentextrakten 1:50 für 30 min in Dunkelheit unter Schütteln inkubiert.

Die Standardkurven wurden in 2% Isopropanol/40 mM PBS, pH 7,6-7,8 angesetzt und Doppelt-Bestimmungen gemessen.

## 3 Analyse mit Gaschromatographie und Massenspektrometer (GC/MS)

Für die Analyse der Sedimentproben wurde die Gaschromatographie in Verbindung mit der Massenspektrometrie verwendet.

### 3.1 Materialien zur Probenaufbereitung

- Kieselgel: Silica 63-200 µm, aktiv, ICN Biochemicals
- NaCl, p.a., KOH, p.a., Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wasserfrei, Kupfer, Merck, Darmstadt, Deutschland
- N-nonane, Promochem, Wesel, Deutschland
- SPE-Kartuschen, 6 mL

- Spitz- und Rundmesskolben (1, 2, 5, 10, 25, 50 mL), Zentrifugenglas, Bachhofer, Deutschland
- 1 mL-Injektionsflaschen für Autosampler mit konisch zulaufendem 200 µL-Einsatz und Alu-Crimp-Kappen mit Teflon/Butylgummi-Septen, Braunglasgläser zur Probenaufbewahrung, Pinzetten

### 3.2 Allgemeine Geräte

- Ultraschallbad, Bandelin, Berlin, Deutschland
- Zentrifuge cryofuge 8500, Kendro Laboratory Products, Asheville, NC, USA
- Rotationsverdampfer, Büchi Labortechnik GmbH, Flawil, Switzerland

### *GC/MS*

Die Verbindungen wurden in Autosampler-Vials überführt und unter den nachfolgend zusammengefassten Gerätebedingungen injiziert:

Gerät: Fisons – GC 8000, Autosampler AS200, Quadrupol-MS MD800

Säule: pesticide II, 30m Länge, 0,31mm Innendurchmesser, 0,25µm Filmdicke, Fa. Restek

Trägergas: He, 2 bar Vordruck, 50 mbar Kopfdruck

Injektor: 220 °C

Injektion: 1 µL Probe

Temperaturprogramm: 1 min bei 80 °C, mit 12 °C/min auf 140 °C, mit 10°C auf 300 °C

Interface-Temperatur: 300 °C

Temperatur der Ionenquelle: 220 °C

Ionisierungsart: Elektronenstoß-Ionisierung (EI), 70 eV

Aufnahme-Modus: Single-Ion-Monitoring (SIM)

Detektierte Ionen sind in **Tab. 8** dargestellt:

**Tab. 8: Im EI-SIM Modus gemessene Masse zur Ladung (m/z) von verschiedenen DDT-Derivaten und <sup>13</sup>C-markierten internen Standards**

	m/z	m/z
	nativ	<sup>13</sup> C-markiert
<i>o,p'</i> -DDT	235/237	
<i>o,p'</i> -DDE	246/248	
<i>o,p'</i> -DDD	235/237	
<i>p,p'</i> -DDT	235/237	247/249
<i>p,p'</i> -DDE	246/248	258/260
<i>p,p'</i> -DDD	235/237	

### 3.3 Extraktion und Aufreinigung der Sedimentproben

Drei Sedimentproben wurden vom Nairobi-Fluss ( Ondire upper“, Outer Ring Road“ und Museum“) gesammelt und ein DDT-freies Sediment wurde 1999 im Liao He, Nord-China, gewonnen (Martens et al., 2000).

Die drei afrikanischen Sedimentproben wurden im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert und vor der Analyse aufgetaut. Vor der Einwaage wurden die Sedimente mit einem Spatel intensiv durchmischt. Das fein gemahlene und trockene chinesische Sediment wurde bei Raumtemperatur gelagert und zur Ermittlung des Blindwertes verwendet.

Die in **Abb. 15** dargestellten Analysenverfahren zum Nachweis von DDT in Nairobi-Fluss-Sedimentproben wurden nach GC/MS-Analyse und Immunoassays aufgearbeitet. Nach der Trockengewichtsbestimmung ( Ondire upper“ 53% Wasser/g, Museum“ 29% Wasser/g und Outer Ring Road“ 33% Wasser/g) wurden die Sedimente wie in **Abb. 15** für die Analysen vorbereitet. Eine Trocknung der Sedimente wurde nicht durchgeführt, das Feuchtsediment direkt extrahiert und als Lösungsmittel Aceton eingesetzt.

- **Extraktion**  
Es wurden 2-3 g Sediment und 1 g Kupfer in ein 100 mL Zentrifugenglas abgewogen, 10 mL Aceton dazugegeben und dann für 2 h im Ultraschallbad extrahiert und alle 15 min geschüttelt. Anschließend wurde bei 2000 upm 10 min zentrifugiert, um einen klaren Extrakt zu bekommen. 10 mL wurden unter einem schwachen Stickstoffstrom bis zur völligen Trockenheit eingengt, dann in 1 mL n-Hexan aufgenommen.
- **Aufreinigung**  
Es wurden 6 mL Kartuschen mit 1 g Kieselgel (mit 1,5 % Wasser deaktiviert) und 1 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (wasserfrei) gefüllt und mit 6 mL 30% Dichlormethan (DCM) in n-Hexan gewaschen. Die Extrakte wurden aufgegeben und mit 9 mL 30% DCM in n-Hexan eluiert. Das Eluat wurde mit n-Hexan auf 10 mL aufgefüllt.
- **Für Immunoassays**  
10 mL Eluat wurden bis zur völligen Trockenheit eingengt und mit 0,5 mL 100% Isopropanol aufgefüllt.
- **Für GC/MS**  
5 mL Eluat wurden unter einem schwachem Stickstoffstrom auf 1 mL eingengt, 150 µL n-nonane und 10 µL interner Standard zugegeben, bis auf 100 µL weiter eingengt und in ein 200 µL Microvial überführt.

**Abb. 15: Darstellung des Analyseverfahrens zum Nachweis von DDT in Sedimentproben vom Nairobi-Fluss**

## III ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 1 Immunoassays

#### 1.1 Herstellung der neuen Immunoreagenzien für DDT

##### 1.1.1 Synthese und Charakterisierung der Hapten-Protein-Konjugate

Erster Schritt bei der Herstellung von mAKs gegen DDT ist die Kopplung dieser Substanz an hochmolekulare Verbindungen wie Trägerproteine (OVA, KLH und BSA), da die Mindestgröße eines Immunogens, um eine Immunantwort zu induzieren, 1kDa betragen muss (Erlanger, 1980).

Man benötigt mehrere Konjugate, weil ein Konjugat mit einem anderen Protein für eine erste Charakterisierung der Überstände verwendet wird. Mit Hilfe dieses Konjugats können die Zell-Linien selektiert werden, die gegen das Immunogen gerichtet waren. Die Kopplung eines Haptens an ein Protein kann mit diversen Methoden durchgeführt werden. Als Kopplungsmethoden kann man die Methode der aktivierten Ester und die Methode der gemischten Anhydride erfolgreich verwenden.

Die Synthese der Hapten-Protein-Konjugate wurde nach einer von Langone & Van Vunakis, 1975, beschriebenen aktivierten Ester-Methode durchgeführt.

Das DDT-Hapten wurde im Auftrag der Firma Solvias, Basel synthetisiert und zur Herstellung von Hapten-Protein-Konjugaten verwendet. Das DDT-Hapten wurde über die Carboxylgruppe dieser Substanz (s. **Abb. 8**) an die Aminogruppe von Proteinen kovalent gekoppelt.

Das DDT-Hapten-OVA- und das DDT-Hapten-KLH-Konjugat wurden auch mit reduziertem Ansatz von DDT-Hapten pro Protein unter denselben Bedingungen noch einmal konjugiert.

Die weiteren Schritte der Konjugation wurden durchgeführt wie für den einfachen Ansatz beschrieben (s. 1.4.1 Material und Methoden, **Methode A**).

Die weiteren Schritte mit reduzierter Menge des DDT-Haptens waren dafür gedacht, die Sensitivität des Assays im Coating Antigen-Format zu verbessern (s. 1.4.1 Material und Methoden, **Methode B**).

Die Kopplungsreaktion zwischen DDT-Hapten und Proteinen wurde spektrophotometrisch durch den Vergleich von DDT-Hapten-Protein-Konjugaten mit jeweils Proteinen und DDT-Hapten bestätigt (**Tab. 9** und **Abb. C1, Anhang**).

Nach der Synthese wurde eine Charakterisierung der jeweiligen Immunisierungskonjugate durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Kopplungsreaktion erfolgreich war. Das DDT-Hapten wurde in einer Konzentration von 20 oder 50 µg/mL in Methanol gemessen, die Proteinkonzentrationen betragen 1 mg/mL in 20 mM PBS; die DDT-Hapten-Protein-Konjugate wurden 1:20 oder 1:50 (Konzentration zwischen 60 und 370 µg/mL) in 20 mM PBS verdünnt.

Das DDT-Hapten zeigte bei 377,8 nm den Höchstwert an. Der Peak 1 [nm] von Proteinen lag bei 277,5 nm für KLH, 278,5 nm für OVA und bei 277,2 nm für BSA (s. **Tab. 9**). Der Höchstwert lag für DDT-Hapten-KLH bei ca. 375 nm, für DDT-Hapten-BSA und für DDT-Hapten-OVA bei 375,8 nm. Es war deutlich sichtbar, dass die Spektren der DDT-Hapten-Protein-Konjugate anders waren als die der jeweiligen Proteine alleine.

**Tab. 9** und **Abb. C1 (A)/(B)/(C)/(D)/(E)/(F)/(G)** stellen die Protein-Konjugate gegenüber, die Spektren zeigten charakteristische Signale.

**Tab. 9: Übersicht zu den UV-Spektren der Konjugate**  
(DDT-Hapten-BSA; -KLH; -OVA)

	Peak 1 [nm]	Peak 2 [nm]	Peak 3 [nm]	Peak 4 [nm]
DDT-Hapten	-	-	321,7	377,8
BSA	277,2	-	-	-
DDT-Hapten-BSA	-	-	321,0	375,8
KLH	277,5	344,7	-	-
DDT-Hapten-KLH	-	-	321,3	ca. 375
OVA	278,5	-	-	-
DDT-Hapten-OVA	-	-	321,0	375,8

Man kann in **Tab. 9** erkennen, dass sich Peak 3 und Peak 4 in jedem Konjugat befinden. Die entsprechenden Wellenlängen sind mit denen des DDT-Haptens vergleichbar. Die im Rahmen dieser Arbeiten durchgeführten Spektra-Messungen bestätigten den Erfolg der Protein-Konjugationen.

Damit konnten wir diese Hapten-Protein-Konjugate sowohl für die Produktion der anti-DDT mAbs als auch zur Entwicklung des Immunoassays einsetzen.



### 1.1.2 Screening der Klone

Für die Immunisierungen wurden aus diesen Konjugaten zwei ausgewählt: DDT-Hapten an OVA und an KLH.

Die Immunisierungen von Ratten, Fusionen, Kultivierung der Myeloma-Zell-Linie und das erste Screening der Kulturüberstände auf der MP, Klonieren und Konservieren der selektionierten Hybridoma-Zellen wurden am Institut für Molekulare Immunologie, GSF (Frau Dr. E. Kremmer) durchgeführt.

Während des ersten Screenings wurden mehrere DDT Klone (1A3, 1A5, 1B2, 1C1, 1E4, 1F1, 1G5, 2B7, 2C11, 2D4, 2G2, 2G5, 2G6, 2G7, 3A11, 3B6, 3C2, 3D6, 3E12, 3G11, 3H11, 4C5, 5C1, 6H11, 7C12, 8A4, 8A5, 8B9, 8D9, 8E2, 9F3, 10B1, 10C3, 10F7, 10F9, 10G5, 12A8, 12B4, 12B10) gefunden, die Antikörper gegen DDT in den Kulturüberstand sekretierten.

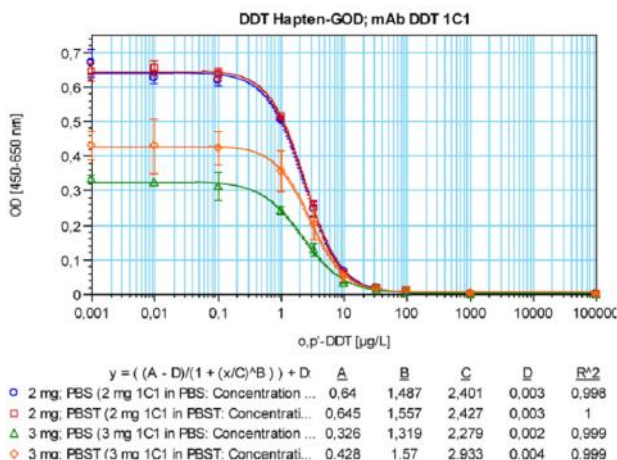
Im zweiten Screening dieser Kulturüberstände wurden dann nochmals im ELISA-Format (Coating Antigen-Format) zweidimensionale Titrations unter Verwendung von zusätzlichem DDT (*o,p'*- und *p,p'*-DDT, 20 µg/L) zur Inhibition getestet. Nur 21 dieser Klone zeigten eine Inhibition mit einem oder beiden DDT-Isomeren. In den restlichen Klonen wurde keine Inhibition gefunden. Von diesen 21 Klonen zeigten 6 eine Inhibition >50% mit *o,p'*- oder *p,p'*-DDT bei einer Konzentration von 10 µg/L. Von diesen 6 Klonen zeigten zwei eine Inhibition von >50% bei 10 µg/L *o,p'*-DDT; drei Klone zeigten bei 10 µg/L *p,p'*-DDT eine Inhibition von >50%, und ein Klon zeigte bei 10 µg/L eine gleiche Inhibition mit *o,p'*-DDT und *p,p'*-DDT. Von diesen ausgewählten Klonen blieben nur drei während der weiteren Subklonierungen stabil. Sie zeigten eine hohe Inhibition und wurden daher zusätzlich nach ihrer Sensitivität und Selektivität gegenüber DDT-Isomeren und -Metaboliten in zwei unterschiedlichen ELISA-Formaten (**Coating Antigen-Format** und **Enzym Tracer-Format**) genauer charakterisiert. Diese anti-DDT mAbs waren DDT IC1, DDT 7C12 und DDT 1B2.

### 1.1.3 Synthese der Hapten-Enzym-Konjugate

Der Tracer ist ein markiertes Hapten (bzw. Antigen) oder ein markierter Antikörper, mit dem der Anteil der Antikörper-Bindungsstellen ermittelt wird, der im Falle des kompetitiven Immunoassays nicht durch den Analyten belegt ist. Tracer wird eingesetzt, um Ak-Ag Reaktion zu quantifizieren. Durch die Einsetzung des Tracers kommt es zwischen Analyt und Tracer zu einer Konkurrenzreaktion um die Antikörper-Bindungsstellen auf der MP. Das Verhältnis, in dem Tracer und Analyt die Antikörper-Bindungsstellen besetzen, spiegelt das Konzentrationsverhältnis in der Lösung wider. Je mehr Analyt sich in der Lösung befindet, desto weniger Tracermoleküle binden sich an der MP-Oberfläche.

Die Hapten-Enzym-Konjugate wurden nach der Methode der aktivierten Ester hergestellt. Als DDT-Hapten wurde dasselbe DDT-Hapten wie für die Hapten-Protein-Konjugation eingesetzt.

Als Tracer wurden die HRP und GOD verwendet, die eine Farbreaktion katalysieren können. Für die GOD-Konjugate wurden zwei Konzentrationen von GOD (DDT-Hapten-GOD, 2 mg und DDT-Hapten-GOD, 3 mg) für die Konjugation verwendet. Als Beispiel wird mAk DDT 1C1 (für die anderen zwei anti-DDT mAks wurden die Ergebnisse nicht dargestellt) in **Abb. 16** gezeigt. Nach der Durchführung in verschiedenen Verdünnungen von zweidimensionaler Titration-ELISA wurde die beste Kombination von Antikörper- und Tracerverdünnungen für jeweils anti-DDT mAks bestimmt.



**Abb. 16:** Vergleich von Standardkurven (OD [450-650 nm]) im Enzym Tracer-Format mit unterschiedlicher Hapten-Enzym-Konjugat-Konzentration (detaillierte Testbedingungen sind in **Tab. 7** dargestellt)  
mAk DDT 1C1 (0,6 mg/mL, 600 ng/mL)  
DDT-Hapten-GOD (2 mg und 3 mg), 1:1.000 in 40 mM PBS

**Abb. 16** zeigt die Standardkurven für *o,p'*-DDT mit synthetisierten Konjugaten, die sowohl in 40 mM PBS als auch in 40 mM PBST eingesetzt wurden. Beim Assay mit DDT-Hapten-GOD (2 mg und 3 mg) und beim Einsatz in verschiedenen Puffern ist eine Konkurrenz zu sehen. Die OD-Werte in Fall DDT-Hapten-GOD, 3 mg, zeigen ca. 0,4 Absorption (OD [450-650 nm]), wobei bei den Testmittelpunkten keine signifikante Änderung zu erkennen ist. Das Ergebnis der nach diesem Verfahren hergestellten Konjugate hat sich als positiv herausgestellt.

## 1.2 Entwicklung eines konventionellen ELISAs

Für die Entwicklung von eigenen Assays wurden die kommerziellen mAk Lib 5-25 und das DDT-Hapten-Protein-Konjugat OVA-DDT5 (Abad et al., 1997) verwendet und mit unseren Immunoreagenzien verglichen.

Die Sensibilität des Immunoassays kann durch das Format beeinflusst werden. Normalerweise ist das erste entwickelte Format bei Immunoassays das **Coating Antigen-Format**, weil es für das Screening von Hybridomen notwendig ist. Die nächste Entwicklungsstufe ist die Bestimmung des **Enzym Tracer-Formats**, denn dieses Format benötigt einen Schritt weniger als das Coating Antigen-Format. Beide Formate haben Vor- und Nachteile. Das Coating Antigen-Format ist überwiegend weniger empfindlich und benötigt mehr Zeit für die Durchführung. Das Enzym Tracer-Format ist andererseits empfindlicher und schneller, aber ein Einfluss der Umweltproben auf das Enzym kann nicht ausgeschlossen werden. Um die am besten geeigneten ELISAs für die neu entwickelten Antikörper zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit beide Formate untersucht.

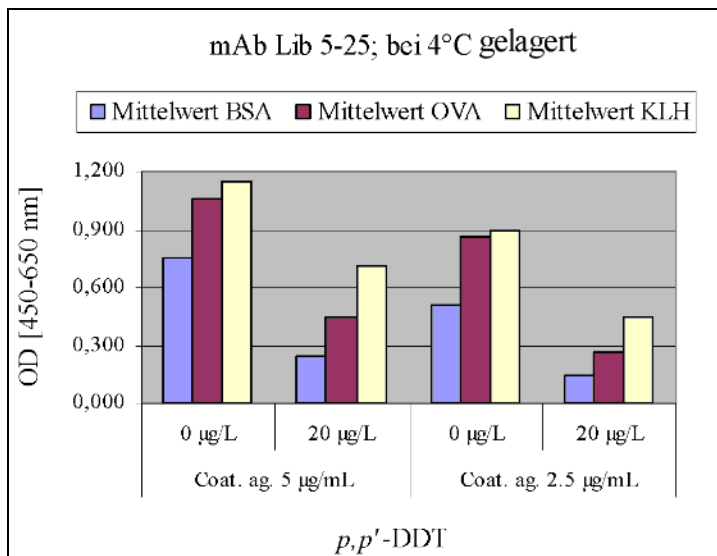
Ferner ist dies für künftige Anwendungen der neu entwickelten anti-DDT mAks in AQUA-OPTOSENSOR von Bedeutung.

Für beide Formate (Coating Antigen-Format und Enzym Tracer-Format) wurden optimale Lösungen für die Immunoreagenzien ausgewählt, um ein hohes Absorptionsvermögen, hohe Sensitivität und ein niedriges Hintergrundsignal zu erhalten.

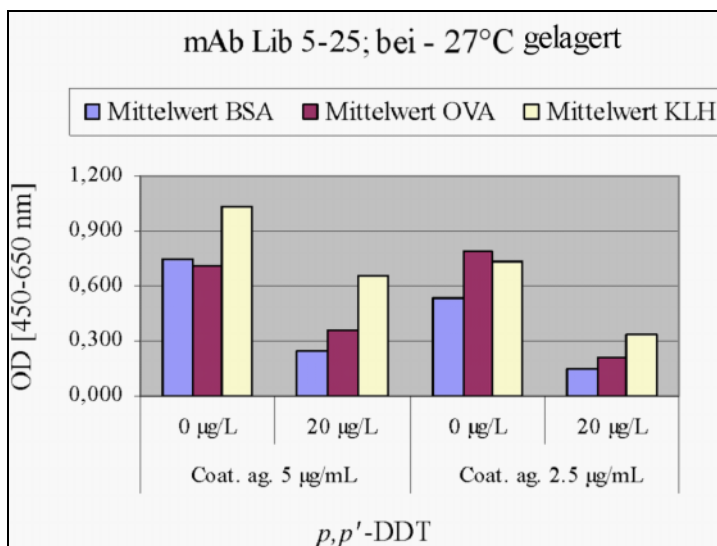
## 1.2.1 Charakterisierung der Antikörper im Coating Antigen-Format

### 1.2.1.1 Einfluss der Lagertemperatur auf die Konkurrenz

Es wurde untersucht, ob die Stabilität durch eine niedrige Lagertemperatur von mAk Lib 5-25 verbessert werden könnte. **Abb. 17 (A)/(B)** zeigt Assays unter den gleichen Bedingungen, mit dem Unterschied, dass vor dem Assay mAk Lib 5-25 bei 4 °C (Kühlschrank) oder bei -27 °C (Gefrierschrank) gelagert wurde.



(A)



(B)

**Abb. 17: Einfluss der Lagertemperatur**

(A) mAk Lib 5-25 (1:1.000) bei 4 °C (Kühlschrank) gelagert

(B) mAk Lib 5-25 (1:1.000) bei -27 °C (Gefrierschrank) gelagert

Die niedrige Lagertemperatur brachte keine Erhöhung der Absorptionswerte (OD [450-650 nm]) und hatte einen positiven Einfluss auf die Stabilität. Bei der Lagerung bei 4 °C verlor der Antikörper nicht an Empfindlichkeit und führte zu reproduzierbaren Ergebnissen. Aus diesem Grund wurde bei weiteren Optimierungsversuchen von mAk Lib 5-25 die Lagerung (in Aliquots) bei 4 °C (Kühlschrank) durchgeführt.

### 1.2.1.2 Tests verschiedener Absättigungsreagenzien

Ein weiterer Schritt zur Verbesserung des Assays sollte durch die Einführung eines Absättigungsschrittes oder durch Zusätze direkt in der Antikörperlösung erreicht werden. Der Einfluss der Absättigung im ELISA-Format wurde untersucht und Änderungen des Testmittelpunktes und der OD-Werte festgestellt. Durch die Absättigung erreicht man eine niedrigere unspezifische Bindung.

Diese Absättigungsschritte sind dafür gedacht, eventuell freie Bindungsstellen auf der MP abzusättigen und den Hintergrund des Assays zu reduzieren. Durch die unspezifische Bindung entsteht ein hoher Hintergrund, der die Auswertung des Ergebnisses erschwert oder verfälscht. In der Literatur (Connolly & Mahy, 2002; Rauch, 2005; Rauch, et al., 2005) ist dies eine häufig angewandte Methode zur Verbesserung der Assays.

In dieser Arbeit wurden im Coating Antigen-Format- und Enzym Tracer-Format-ELISA verschiedene Absättigungs-Möglichkeiten optimiert.

Nach der Immobilisierung des Hapten-Protein-Konjugats wurde in einem zweiten Schritt (nach dem Coating mit Hapten-Protein-Konjugat) für die Optimierung von mAk DDT 7C12, **Tab. 10 (A)/(B)**, und mAk DDT 1B2, **Tab. 11 (A)/(B)**, 1% (w/v) Milchpulver auf die MP für eine Stunde aufgetragen.

**Tab. 10: 4-Parameter-Werte und Kreuzreaktivitäten (% CR) im Coating Antigen-Format**

mAk DDT 7C12 (125 ng/mL) und DDT-Hapten-OVA<sup>1/4</sup> (1 µg/mL)

(A) *p,p'*-DDT in 40 mM PBS

(B) DDT-Metaboliten in 40 mM PBS

**Bemerkung:** Absättigung mit 1% (w/v) Milchpulver/1h.

<i>p,p'</i> -DDT	A	B	C [µg/L]	D	R	% CR
	1,263	1,202	<b>0,837</b>	-0,003	0,994	<b>100</b>
	1,766	1,598	<b>1,951</b>	0,055	0,999	<b>100</b>
	1,038	1,209	<b>1,584</b>	8,80E-04	0,996	<b>100</b>

(A)

Analyt	A	B	C [ $\mu\text{g/L}$ ]	D	R	% CR
<i>p,p'</i> -DDD	1,183	1,377	<b>2,155</b>	0,013	0,998	<b>39</b>
<i>o,p'</i> -DDD	1,32	1,162	<b>6,76</b>	0,025	0,991	<b>12</b>
<i>p,p'</i> -DDE	1,764	1,126	<b>4,258</b>	0,072	0,998	<b>46</b>
<i>o,p'</i> -DDE	1,808	0,940	<b>31,04</b>	0,023	0,994	<b>6</b>
<i>o,p'</i> -DDT	1,072	1,199	<b>3,173</b>	0,018	0,997	<b>50</b>
<i>p,p'</i> -DDA	1,189	0,16	<b>6,45E+09</b>	-3,259	0,910	<b>0,01</b>

**(B)**

Die Testmittelpunkte des optimierten ELISA (gleicher Tag auf verschiedene MP) mit mAk DDT 7C12 liegen bei 0,837  $\mu\text{g/L}$ , 1,951  $\mu\text{g/L}$  und 1,584  $\mu\text{g/L}$  mit sehr guten OD-Werten (A = 1,263; 1,766; 1,038). Daraus kann geschlossen werden, dass die Absättigung mit 1% (w/v) Milchpulver/1h sehr effektiv für die Assayentwicklung ist. Dementsprechend wurden für die Optimierungen der DDT-Metaboliten Assays für dieselben Absättigungsmöglichkeiten beibehalten.

**Tab. 11: 4-Parameter-Werte und Kreuzreaktivitäten (% CR) im Coating Antigen-Format**

mAk DDT 1B2 (500 ng/mL) und DDT-Hapten-OVA $\frac{1}{4}$  (1  $\mu\text{g/mL}$ )

(A) *p,p'*-DDT in 40 mM PBS

(B) DDT-Metaboliten in 40 mM PBS

**Bemerkung:** Absättigung mit 1% Milchpulver/1h.

<i>p,p'</i> -DDT	A	B	C [ $\mu\text{g/L}$ ]	D	R	% CR
	1,539	1,109	<b>8,548</b>	-0,002	0,998	<b>100</b>
	1,506	0,939	<b>11,436</b>	-0,016	0,994	<b>100</b>
	1,58	1,101	<b>20,63</b>	-0,013	0,997	<b>100</b>

**(A)**

Analyt	A	B	C [ $\mu\text{g/L}$ ]	D	R	% CR
<i>p,p'</i> -DDD	1,582	1,274	<b>37,29</b>	-0,009	0,996	<b>23</b>
<i>o,p'</i> -DDD	1,577	0,817	<b>309,321</b>	-0,022	0,998	<b>3</b>
<i>p,p'</i> -DDE	1,596	0,456	<b>8,081,7</b>	-1,252	0,994	<b>0,1</b>
<i>o,p'</i> -DDE	1,547	0,317	<b>4,18E+07</b>	-9,414	0,960	<b>0,1</b>
<i>o,p'</i> -DDT	1,677	0,487	<b>4,836,572</b>	0,698	0,976	<b>0,4</b>
<i>p,p'</i> -DDA	1,612	0,577	<b>122,018,6</b>	-2,038	0,969	<b>0,01</b>

**(B)**

Als bestes Absättigungsmittel für den mAk DDT 1B2 hat sich 1% (w/v) Milchpulver/1h herausgestellt, das auf eine geringe unspezifische Bindung des mAk DDT 1B2 zurückzuführen ist. Allerdings wurden signifikante Unterschiede in Bezug auf Testmittelpunkte (gleicher Tag auf verschiedenen MP) von 8,548 [ $\mu\text{g/L}$ ] auf die erste MP zu 11,436 [ $\mu\text{g/L}$ ] auf die zweite MP und zu 20,63 [ $\mu\text{g/L}$ ] auf die letzte MP beobachtet.

Die großen Unterschiede zwischen den IC 50% von MP zu MP der beiden mAks (DDT 1B2 wies zum Teil fast das 10fache des DDT 7C12 auf, welches wiederum keine Änderungen aufwies) können theoretisch nur schwer erklärt werden. Die möglichen akzeptablen Erklärungen können hier lediglich vermutet werden.

Dies kann einerseits auf die Reihenfolge von Pipettierungen der Analyte zurückgeführt werden. Andererseits kann es darauf hindeuten (da der mAk DDT 1B2 dadurch nicht sensitiv ist), dass die Stabilität des Antikörpers eine wichtige Rolle spielt.

Für die Optimierung mit mAk DDT 1C1 war ein zweiter Absättigungsschritt nicht notwendig, aber der mAk DDT 1C1 wurde in 0,1% (w/v) BSA in 40 mM PBS angesetzt. Anhand der Ergebnisse erkennt man, dass die oben beschriebenen Optimierungen zu einer Verbesserung der Assays beitragen konnten. Detaillierte optimierte Testbedingungen zur Versuchsdurchführung sind in 1.5.1.1 Material und Methoden dargestellt.

In der Literatur (Abad et al., 1997) zeigte sich durch die Optimierungen des Absättigungsreagenziens, dass mit einem Ansatz von 0,1% BSA/40 mM PBS, in mAk DDT Lib 5-25-Lösung die besten Ergebnisse erreicht werden konnten.

### 1.2.1.3 Bestimmung von Kreuzreaktivitäten

Ein weiterer Punkt der mAks DDT-Charakterisierung war die Ermittlung der Kreuzreaktivitäten. Die Kenntnis der Kreuzreaktivitäten ist eine wichtige Grundlage für den späteren Einsatz des Antikörpers.

In dieser Arbeit wurde zuerst das Bindungsverhalten des kommerziellen mAk DDT Lib 5-25 und neu entwickelten anti-DDT mAks mit DDT und Metaboliten (DDD, DDE, DDA) und ihren *o*- und *p*-Isomeren bestimmt.

Dazu wurden die in **Tab. 4** und **Tab. 5** im Coating Antigen-Format für mAk DDT Lib 5-25 beschriebenen ELISAs eingesetzt. Die Standardreihen für alle DDT-Metaboliten und -Isomere wurden mit denselben Konzentrationen und Assay-Bedingungen auf die MP aufgetragen. Die DDT-Standardkurve (40 mM PBS, 0,01-10.000 µg/L) wurde unter Verwendung von 4-Parametergleichung in SOFTmax<sup>®</sup> Pro ausgewertet.

Anschließend wurden die Testmittelpunkte verglichen.

**Abb. B1 (A)/(B)/(C)/(D) (Anhang, Teil B)** zeigt die Auswertung in % Control mit mAk Lib 5-25 im Coating Antigen-Format-ELISA mit DDT-Hapten-KLH, DDT-Hapten-OVA, DDT-Hapten-BSA und DDT-OVA (Spanien). Weiterhin zeigt die **Tab. 12** die Testmittelpunkte [µg/L] und die berechneten Kreuzreaktivitäten der neu herge-

stellten Coating Antigene DDT-Hapten-KLH, -BSA, -OVA im Vergleich zu dem gekauften Coating Antigen OVA-DDT5 für den mAk Lib 5-25.

**Tab. 12: Testmittelpunkte [ $\mu\text{g/L}$ ] und Kreuzreaktivitäten (% CR) mit mAk Lib 5-25**

**Bedingungen für die Immunoreagenzien** (detaillierte Testbedingungen sind in Tab. 4, dargestellt):

OVA-DDT 5 (Spanien), 1 mg/mL (1  $\mu\text{g/mL}$ )

DDT-Hapten-OVA, 4,8 mg/mL (0,7  $\mu\text{g/mL}$ )

DDT-Hapten-KLH, 6,25 mg/mL (2  $\mu\text{g/mL}$ )

DDT-Hapten-BSA, 7,35 mg/mL (2  $\mu\text{g/mL}$ )

mAk Lib 5-25, 500  $\mu\text{g/mL}$  (250 ng/mL)

Ziege-anti-Maus-POD, 1:50.000

n.d. = nicht durchgeführt

	OVA-DDT5 (Spanien) Abad et al., 1997	OVA-DDT5 (Spanien)	DDT-Hapten- OVA	DDT-Hapten- KLH	DDT-Hapten- BSA
<b>4-Parameter- Werte</b>	-	A=0,453 B=0,931	A=0,226 B=0,625	A=0,275 B=0,614	A=0,158 B=0,611
<b><i>p,p'</i>-DDT</b>		<b>C=2,4 <math>\mu\text{g/L}</math></b> D=0,005 R <sup>2</sup> =0,998	<b>C=7 <math>\mu\text{g/L}</math></b> D=-0,003 R <sup>2</sup> =0,993	<b>C=9,7 <math>\mu\text{g/L}</math></b> D=0,006 R <sup>2</sup> =0,99	<b>C=7 <math>\mu\text{g/L}</math></b> D=-0,007 R <sup>2</sup> =0,983
<b>Analyt</b>					
<b><i>p,p'</i>-DDT</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<i>o,p'</i> -DDT	61,3	35	24	30	21
<i>p,p'</i> -DDD	223,9	327	284	435	527
<i>o,p'</i> -DDD	81,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p,p'</i> -DDE	92,4	85	71	55	104
<i>o,p'</i> -DDE	26,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Es zeigte sich, dass man mit dem Coating Antigen OVA-DDT5 (Spanien) im Allgemeinen einen besseren Testmittelpunkt erzielen konnte als mit den neu hergestellten Hapten-Protein-Konjugaten. Dies kann eventuell auf eine unterschiedliche Kopplungsrate von DDT-Hapten an Protein zurückgeführt werden. Aus diesem Grund wurde es als nächste Möglichkeit angesehen, neue Hapten-Protein-Konjugate (mit reduziertem DDT-Hapten-Ansatz) zu synthetisieren, um die Konkurrenz zu verbessern (s. 1.2.1.3.1). Das Erkennungsmuster der Kreuzreaktivitätswerte aus der Literatur (OVA-DDT5, Spanien) glich dem unserer hergestellten Hapten-Protein-Konjugate (DDT-Hapten-OVA, DDT-Hapten-KLH, und DDT-Hapten-BSA).



### 1.2.1.3.1 Hapten-Protein-Konjugate mit reduziertem DDT-Hapten-Einsatz und Bestimmung von Kreuzreaktivitäten

Es wurden Konjugate aus den DDT-Hapten<sup>1/2</sup> und DDT-Hapten<sup>1/4</sup> mit OVA und KLH nach der Methode der aktivierten Ester hergestellt und im ELISA mit mAk Lib 5-25 und mit den neu entwickelten anti-DDT mAks getestet (**Abb. B1 (E)/(F)/(G)/(H), Anhang, Teil B**).

Während der Verbindung von DDT-Hapten<sup>1/2</sup> und DDT-Hapten<sup>1/4</sup> wurde nur bei der Konjugation die Hälfte bzw. ein Viertel des DDT-Haptens eingesetzt. Mit diesem reduzierten DDT-Hapten-Einsatz im Coating Antigen kann der Analyt bei niedrigeren Konzentrationen besser konkurrieren.

Nach den ersten Untersuchungen und der Charakterisierung erwiesen sich DDT-Hapten-OVA<sup>1/4</sup> und DDT-Hapten-KLH<sup>1/4</sup> als die Coating Antigene, welche empfindlichste Standardkurven ergaben.

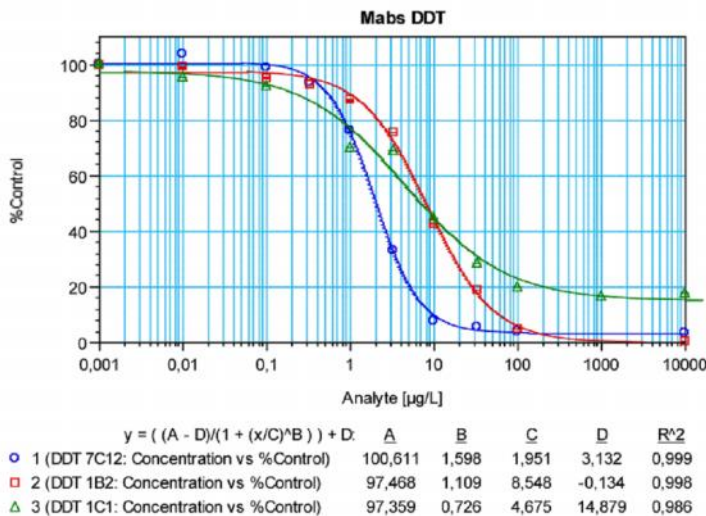
Die Kreuzreaktivitäten-Werte (% CR) im Coating Antigen-Format mit mAk Lib 5-25 sind in der **Tab. 13** dargestellt. Für diese Tests wurde DDT-Hapten-OVA<sup>1/4</sup> als Coating Antigen benutzt. Die DDT-Standardkurve (40 mM PBS, 0,01-10.000 µg/L) wurde unter Verwendung von 4-Parametergleichung in SOFTmax<sup>®</sup> Pro ausgewertet.

**Tab. 13: Kreuzreaktivitäten (% CR) mit mAk Lib 5-25**  
im Coating Antigen-Format-ELISA mit DDT-Hapten-OVA<sup>1/4</sup>  
**Bedingungen für die Immunoereagenzien** (detaillierte Testbedingungen sind in **Tab. 4**, dargestellt):  
DDT-Hapten-OVA<sup>1/4</sup>, 4,8 mg/mL (2 µg/mL)  
mAk Lib 5-25, 500 µg/mL (250 ng/mL)  
Ziege-anti-Maus-POD, 1:50.000

Analyt	DDT-Hapten-OVA <sup>1/4</sup> mAk Lib 5-25
<b><i>p,p'</i>-DDT</b>	<b>100</b>
<i>o,p'</i> -DDT	48
<i>p,p'</i> -DDD	330
<i>o,p'</i> -DDD	75
<i>p,p'</i> -DDE	104
<i>o,p'</i> -DDE	19
<i>p,p'</i> -DDA	≤ 0,01

Im Vergleich zu den Werten aus der Literatur (Abad et al., 1997), **Tab. 12**, zeigt mAk Lib 5-25 mit DDT-Hapten-OVA $\frac{1}{4}$  durchwegs die gleiche Tendenz und Selektivität mit OVA-DDT5 für die *p,p'*-Isomere und *o,p'*-Isomere.

Mit den reduzierten DDT-Hapten-Einsatz-Konjugaten wurden auch die hergestellten anti-DDT mAks (**1C1, Rat IgG2b**, ; **7C12, Rat IgG2a**, und **1B2, Rat IgG2a**, ) getestet. Die optimierten Standardkurven (% Control) mit deren Testmittelpunkten (IC 50%) und Kreuzreaktivitäten (% CR) im Coating Antigen-Format sind in der **Abb. 18** und **Tab. 14** dargestellt.



**Abb. 18:** Optimierte Standardkurven (% Control) im Coating Antigen-Format mit DDT-Hapten-OVA $\frac{1}{4}$ .

( ) *p,p'*-DDT (n=2) mit mAk DDT 7C12 (125 ng/mL): A = 100; B = 1,598; C (IC 50%) = 1,951; D = 3,132.

( ) *p,p'*-DDT (n=2) mit mAk DDT 1B2 (500 ng/mL): A = 97,468; B = 1,109; C (IC 50%) = 8,548; D = -0,134.

( ) *o,p'*-DDT (n=2) mit mAk DDT 1C1 (250 ng/mL): A = 97,359; B = 0,726; C (IC 50%) = 4,675; D = 14,879.

DDT-Standardkurven (40 mM PBS, 0,01-10.000 µg/L) wurden unter Verwendung von 4-Parameteregleichung in SOFTmax<sup>®</sup> Pro ausgewertet.

Die Tests von sieben Substanzen (DDT-Isomere, -Metaboliten und das DDT-Hapten) zur Kreuzreaktion in diesem ELISA-Format mit allen drei anti-DDT mAks führten zu dem Schluss, dass diese ELISAs für die sensitive und selektive Erkennung von DDT-Isomeren und -Metaboliten geeignet waren. Die IC 50%-Werte und die Kreuzreaktionen (% CR) sind in der **Tab. 14** dargestellt.

**Tab. 14: Testmittelpunkte [ $\mu\text{g/L}$ ] und Kreuzreaktivitäten (% CR) von DDT-Isomeren und -Metaboliten im Coating Antigen-Format-ELISA mit DDT-Hapten-OVA $^{1/4}$  mit den neuen anti-DDT mAks.**  
**Bedingungen für die Immunoreagenzien** (detaillierte Testbedingungen sind in **Tab. 4**, dargestellt):  
DDT-Hapten-OVA $^{1/4}$ , 0,5  $\mu\text{g/mL}$  (für mAk DDT 1C1) und 1  $\mu\text{g/mL}$  (für mAk DDT 7C12 und für mAk DDT 1B2)  
mAk DDT 1C1, 500 ng/mL  
mAk DDT 7C12, 125 ng/mL  
mAk DDT 1B2, 500 ng/mL  
n=Anzahl von die IC 50%-Werte.

mAk	mAk DDT 1C1		mAk DDT 7C12		mAk DDT 1B2	
Analyt	IC 50% [ $\mu\text{g/L}$ ]	% CR	IC 50% [ $\mu\text{g/L}$ ]	% CR	IC 50% [ $\mu\text{g/L}$ ]	% CR
<i>o,p'</i> -DDT	4,2 $\pm$ 0,5 (n=13)	100	2,7 $\pm$ 0,9 (n=4)	56 $\pm$ 11,3	$\geq$ 1.000	0,1
<i>p,p'</i> -DDT	6,1 $\pm$ 0,9 (n=3)	75 $\pm$ 3,5	1,8 $\pm$ 0,7 (n=15)	100	7,5 $\pm$ 2,2 (n=12)	100
<i>o,p'</i> -DDD	3,9 $\pm$ 0,8 (n=3)	91 $\pm$ 10,1	6,4	15	223	4
<i>p,p'</i> -DDD	30,2 $\pm$ 4,5 (n=3)	12 $\pm$ 2,5	1,5 $\pm$ 0,4 (n=3)	98,3 $\pm$ 2,9	13,0 $\pm$ 1,8 (n=3)	65,0 $\pm$ 3,5
<i>o,p'</i> -DDE	3,2 $\pm$ 0,3 (n=3)	141 $\pm$ 16,7	31	6	$\geq$ 10.000	0,01
<i>p,p'</i> -DDE	35,1 $\pm$ 4,1 (n=3)	13 $\pm$ 1,2	3,4	51	106,4 $\pm$ 6,3 (n=3)	8,3 $\pm$ 1,2
<i>p,p'</i> -DDA	$\geq$ 10.000 (n=3)	0,01	$\geq$ 10.000	0,01	$\geq$ 10.000	0,01
DDT-Hapten	1,0 $\pm$ 0,1 (n=6)	421 $\pm$ 33,4	0,7 $\pm$ 0,1 (n=3)	255 $\pm$ 54,2	2,4 $\pm$ 0,4 (n=3)	282 $\pm$ 31,7

Der mAk **DDT 1C1** (**Tab. 14**, **Abb. 18**) erkennt alle getesteten *o,p'*-Isomere am besten. Das DDT-Isomer, das am besten erkannt wurde, war *o,p'*-DDE, mit einem IC 50% von 3,2  $\pm$  0,3  $\mu\text{g/L}$  (n=3). Der *o,p'*-DDT (*o,p'*-DDT entspricht 100% CR) kann mit einem IC 50%-Wert von 4,2  $\pm$  0,5  $\mu\text{g/L}$  (n=13) mit einem Messbereich zwischen 0,5-30  $\mu\text{g/L}$  (90-10% Control) gemessen werden. Dieser anti-DDT mAk zeigt zusätzlich ca. 90% CR für *o,p'*-DDD und für *p,p'*-DDT 75% CR an, was relevant sein kann, wenn in der Probe beide Isomere vorhanden sind.

Der mAk **DDT 7C12** (**Tab. 14**, **Abb. 18**) zeigt den höchsten % CR für *p,p'*-Isomere. *p,p'*-DDT kann mit einem IC 50%-Wert von 1,8  $\pm$  0,7  $\mu\text{g/L}$  (n=15) analysiert werden. Der Messbereich ist zwischen 0,5-8  $\mu\text{g/L}$ . Eine vergleichbare Selektivität zeigt der mAk DDT 7C12 für *p,p'*-DDD (98% CR) und relevante % CRs für alle Isomere und Metaboliten, nur für *o,p'*-DDE zeigt er eine geringere CR (6%).

Der am wenigsten empfindliche anti-DDT mAk, jedoch der selektivste der drei Ratten mAks, ist **DDT 1B2** (**Tab. 14**, **Abb. 18**), welcher *p,p'*-DDT mit einem IC 50%-Wert von 7,5  $\pm$  2,2  $\mu\text{g/L}$  (n=12) erkennt. Der Messbereich ist zwischen 1-70  $\mu\text{g/L}$ . Dieser anti-DDT mAk erkennt nicht die *o,p'*-DDT-Metaboliten, der einzige Metabolit mit entsprechendem % CR ist der *p,p'*-DDD (65%).

*p,p'*-DDA wurde von keinem der anti-DDT mAks erkannt.

Das Coating Antigen-Format wurde ebenfalls zur Testung der Erkennung des immunisierenden DDT-Haptens angewandt. Wie man anhand der **Tab. 14** sehen kann, wurde das DDT-Hapten mit hohem % CR bei allen mAks erkannt. Die höchste Kreuzreaktivität wurde bei mAk DDT 1C1 (ca. 420% CR) beobachtet, gefolgt von mAk DDT 1B2 (ca. 280% CR) und mAk DDT 7C12 (ca. 250% CR). Diese Beobachtung reflektiert sehr gut die Sensitivität und Selektivität der Assays für die DDT-Metaboliten und dass anti-DDT mAks die größte Affinität gegen die Substanz DDT-Hapten entwickeln. Insgesamt zeigen die neu entwickelten anti-DDT mAks, dass von diesen der mAk 7C12 im Kreuzreaktivitätsmuster dem mAk Lib5-25 am meisten ähnelt (Abad et al., 1997). Der mAk DDT 7C12 hat aber im Vergleich zu mAk Lib5-25 im Allgemeinen niedrigere Kreuzreaktivitäten gegenüber allen Isomeren und Metaboliten, die getestet wurden. Dies trifft insbesondere auf *p,p'*-DDD zu.

## **1.2.2 Charakterisierung der Antikörper im Enzym Tracer-Format**

Für die Charakterisierung der anti-DDT mAks und künftige Anwendungen im Immunosensor wurden HRP und GOD als Enzyme für das Enzym Tracer-Format ausgewählt. Die sich ergebenden Enzym Tracer-Konjugate (DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD) wurden mit mAk Lib 5-25 und den neu entwickelten anti-DDT mAks in kompetitiven ELISAs getestet.

### **1.2.2.1 Tests verschiedener Precoatings**

In diesem ELISA-Format wurden mehrere Vorbeschichtungen für den Maus Antikörper (**mAk Lib 5-25**) und Ratte Antikörper (**mAk DDT 1C1**, **mAk DDT 7C12** und **mAk DDT 1B2**) in verschiedenen Konzentrationen für die Vorbeschichtungen der MP eingesetzt. Die Ergebnisse sind in **Tab. 15** dargestellt.

Die DDT-Standardkurven (40 mM PBS, 0,01-10.000 µg/L) wurden unter Verwendung von 4-Parametergleichung in SOFTmax<sup>®</sup> Pro ausgewertet.

**Tab. 15: Enzym Tracer-Format mit verschiedenen Vorbeschichtungen der MP** (Ziege-anti-Maus, Maus-anti-Ratte kappa (TIB 172), Maus-anti-Ratte lambda LA 1B12, Protein A, Protein L, Protein G, Protein A/G, 2 µg/mL)  
**Bedingungen für die Immunoreagenzien** (detaillierte Testbedingungen sind in **Tab. 5**, dargestellt):  
mAk Lib 5-25, 250 ng/mL; DDT-Hapten-HRP (1:4.000) und DDT-Hapten-GOD (1:2.000)  
mAk DDT 1C1, 500 ng/mL; DDT-Hapten-HRP (1:8.000) und DDT-Hapten-GOD (1:1.000)  
mAk DDT 7C12, 125 ng/mL; DDT-Hapten-HRP (1:8.000) und DDT-Hapten-GOD (1:1.000)  
mAk DDT 1B2, 250 ng/mL; DDT-Hapten-HRP (1:1.000) und DDT-Hapten-GOD (1:1.000)

+++ = sehr effektive Immobilisierung  
 ++ = effektive Immobilisierung  
 + = wenig effektive Immobilisierung  
 - = keine Immobilisierung

Vorbeschichtungen	mAk Lib 5-25	mAk DDT 1C1	mAk DDT 7C12	mAk DDT 1B2
Ziege-anti-Maus	+++	-	-	-
Maus-anti-Ratte kappa (TIB 172)	-	+++	-	+++
Maus-anti-Ratte lambda LA 1B12	-	-	+++	-
Protein A	-	-	-	-
Protein L	-	-	+++	-
Protein G	+	+	+	-
Protein A/G	++	++	-	-

Es stellte sich heraus, dass Ziege-anti-Maus für die Vorbeschichtung der MP die effektivste Immobilisierung der mAk Lib 5-25 mit beiden Enzym-Konjugaten (DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD) ermöglichte.

Für die mAk DDT 1C1 und mAk DDT 1B2 zeigte die Vorbeschichtung der MP mit Maus-anti-Ratte (TIB 172) eine effektive Immobilisierung mit beiden Enzym-Konjugaten (DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD).

Sowohl die Vorbeschichtung der MP mit Maus-anti-Ratte lambda LA 1B12 als auch mit Protein L bewirkten eine effektive Immobilisierung der mAk DDT 7C12 mit beiden Enzym-Konjugaten (DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD).

Auch mit Protein A/G wurden effektive Immobilisierungen von mAks, allerdings nur von mAk Lib 5-25 und mAk DDT 1C1, in ELISA-Tests mit beiden Enzym-Konjugaten (DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD) gezeigt.

Für alle getesteten anti-DDT mAks wurden mit Protein A und Protein G keine ausreichenden Bindungen der Antikörper ermöglicht.

### 1.2.2.2 Tests verschiedener Absättigungsreagenzien

Um eine unspezifische Bindung an der Polystyroloberfläche der MP zu verhindern, wurden die anti-DDT mAks und/oder Enzym Tracer-Konjugate in Lösungen mit verschiedenen Absättigungsreagenzien (BSA, OVA und Milchpulver und/oder LowCross Buffer (CANDOR Bioscience GmbH, Münster)) eingesetzt.

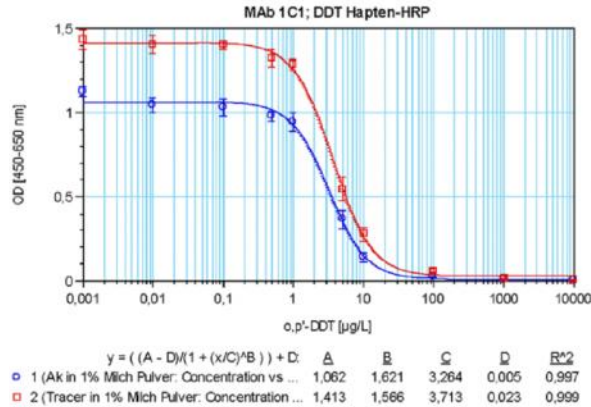
Als Beispiel wurden Standardkurven mit 4-Parameter-Werten im Enzym Tracer-Format-ELISA für mAk DDT 1C1 (**Abb. 19 (A)/(B)**; **Tab. B1 (A)/(B)**; **Tab. B2 (A)/(B)/(C)/(D)**), für mAk DDT 7C12 mit DDT-Hapten-HRP (**Abb. 19 (C)**) und mit DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD (**Tab. B3**) und für mAk DDT 1B2 mit DDT-Hapten-HRP (**Abb. 19 (D)/(E)**) und mit DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD (**Tab. B4**) dargestellt.

Für mAk DDT 1C1 wurden die Absättigungsreagenzien in folgenden verschiedenen Konzentrationen eingesetzt: mAk DDT 1C1 in 1% (w/v) Milchpulver (in 40 mM PBS) und DDT-Hapten-HRP in 40 mM PBS, (**Abb. 19 (A) ( )**); mAk DDT 1C1 in 40 mM PBS und DDT-Hapten-HRP in 1% (w/v) Milchpulver (40 mM PBS), (**Abb. 19 (A) (□)**); mAk DDT 1C1 und DDT-Hapten-HRP in 1% (w/v) Milchpulver (in 40 mM PBS), (**Abb. 19 (B) ( )**). Um zu überprüfen, ob der mAk DDT 1C1 auch ohne Absättigungsreagenzien genügend sensitive Standardkurven erreichen kann, wurde ein Assay mit mAk DDT 1C1 und DDT-Hapten-HRP in 40 mM PBS durchgeführt, **Abb. 19 (B) (□)**.

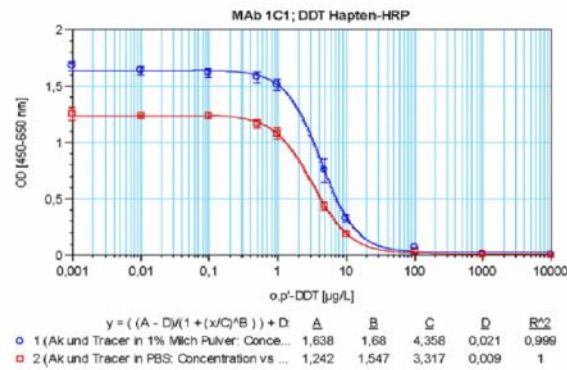
Für mAk DDT 7C12 wurden die Absättigungsreagenzien in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt: mAk DDT 7C12 in 1% (w/v) Milchpulver (in 40 mM PBS) und DDT-Hapten-HRP in 40 mM PBS; mAk DDT 7C12 in 3% (w/v) Milchpulver (in 40 mM PBS) und DDT-Hapten-HRP in 40 mM PBS; mAk DDT 7C12 in 0,1% (w/v) BSA (in 40 mM PBS) und DDT-Hapten-HRP in 40 mM PBS; mAk DDT 7C12 in 0,5% (w/v) BSA (in 40 mM PBS) und DDT-Hapten-HRP in 40 mM PBS, **Abb. 19 (C)**.

Für mAk DDT 1B2 wurden die Absättigungsreagenzien in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt: mAk DDT 1B2 (250 ng/mL) und DDT-Hapten-HRP in verschiedenen Konzentrationen (1:4.000 und 1:8.000) in 40 mM PBS; mAk DDT 1B2 (125 ng/mL) und DDT-Hapten-HRP in verschiedenen Konzentrationen (1:4.000 und 1:8.000) in 1% LCB, **Abb. 19 (D)**; mAk DDT 1B2 in 1% (w/v) Milchpulver (in 40 mM PBS) und DDT-Hapten-HRP in 40 mM PBS; mAk DDT 1B2 in 3% (w/v) Milchpulver (in 40 mM

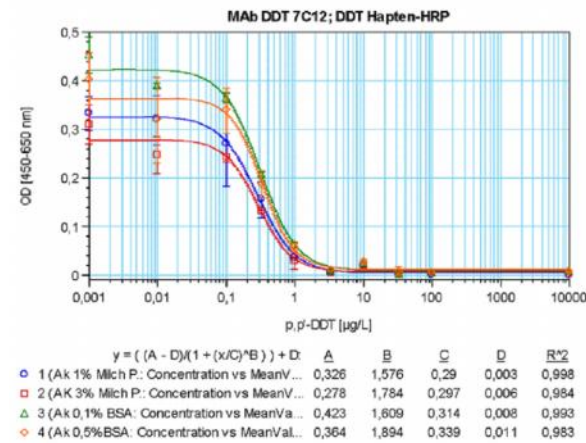
PBS) und DDT-Hapten-HRP in 40 mM PBS; mAk DDT 1B2 in 0,1% (w/v) BSA (in 40 mM PBS) und DDT-Hapten-HRP in 40 mM PBS; mAk DDT 1B2 in 0,5% (w/v) BSA (in 40 mM PBS) und DDT-Hapten-HRP in 40 mM PBS, **Abb. 19 (E)**.



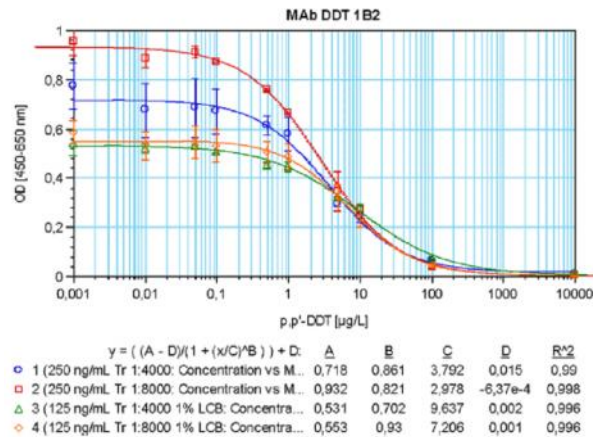
(A)



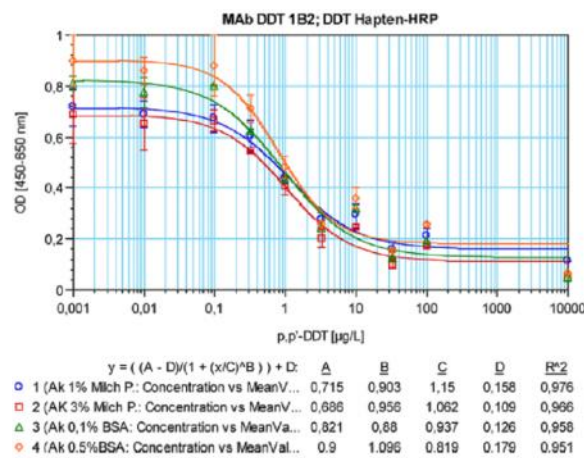
(B)



(C)



(D)



(E)

**Abb. 19: 4-Parameter-Standardkurven – Einfluss verschiedener Absättigungsreagenzien und Konzentrationen auf die Assays**

(A)/(B) mAk DDT 1C1, 0,6 mg/mL (1.000 ng/mL); DDT-Hapten-HRP 1:4.000

(C) mAk DDT 7C12, 6 mg/mL (125 ng/mL); DDT-Hapten-HRP 1:8.000

(D)/(E) mAk DDT 1B2, 1,3 mg/mL (250 ng/mL); DDT-Hapten-HRP 1:1.000

Es wurde die Absättigungsmöglichkeit gesucht, die die besten Testmittelpunkte, den niedrigsten Hintergrund und die höchsten OD-Werte für die anti-DDT mAks im Enzym Tracer-Format erreichen kann.

Die kompetitiven ELISAs wurden, wie in **Tab. 6** beschrieben, fortgesetzt. Bei der Auswertung dieser Versuche ergab sich, dass die getesteten Absättigungsreagenzien nur mit einem kleinen positiven Einfluss zur Verbesserung der Assays beitragen. Sie konnten mit gleichem Erfolg im ELISA eingesetzt werden. Eine Absättigung mit verschiedenen Konzentrationen von gleichen Absättigungsmitteln für alle anti-DDT mAks zeigte fast dieselben Testmittelpunkte, OD-Werte und niedrigsten Hintergründe.



Anhand der Ergebnisse (Kurvenverläufe) wurde 1% (w/v) Milchpulver (in 40 mM PBS) als Absättigungsmittel in allen drei anti-DDT mAks für weitere Optimierungen ausgewählt.

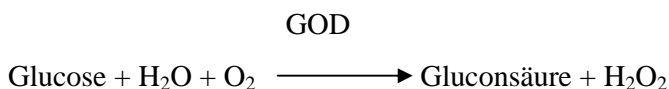
DDT-Standard-Kurven (40 mM PBS, 0,01-10.000 µg/L) wurden unter Verwendung von 4-Parameteregleichung in SOFTmax<sup>®</sup> Pro ausgewertet.

### 1.2.2.3 Tests verschiedener Substrat-Konzentrationen

Für die enzymatisch katalysierte Farbreaktion durch das gebundene Hapten-Enzym-Konjugat wird nach dem Auswaschen der MP eine Substratlösung zugefügt. Die Intensität des Signals ist direkt proportional zur Menge des gebundenen Enzyms und umgekehrt proportional zur Menge des Analyts in der Probenlösung. Das Substrat besteht aus ( ). Als Substratpufferlösung dient 100 mM Natriumacetatpuffer pH 5,5. Durch die Peroxidase des Hapten-Enzym-Konjugates wird Wasserstoffperoxid in OH-Radikale gespalten, welche einer Aminogruppe des TMB ein Elektron entreißen. Das TMB-Radikalkation ist blau gefärbt und entsteht unter Entwirkung von Wasserstoffperoxid aus der farblosen Leukoform TMBH<sub>2</sub>.



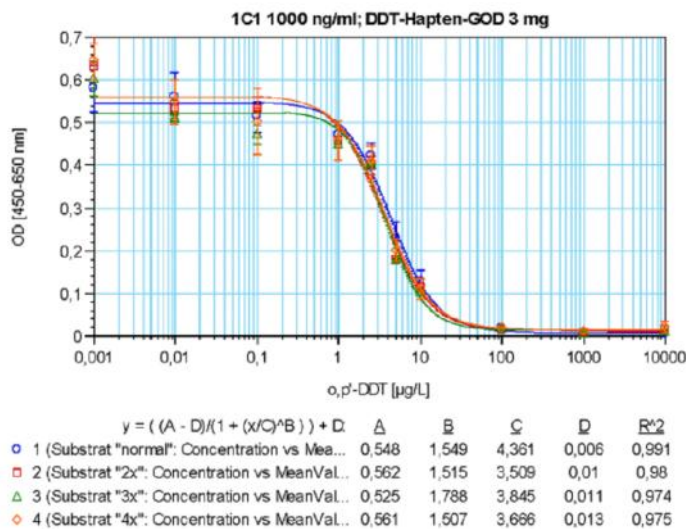
Bei dem GOD-Test (die Glucose wird umgesetzt), oxidiert die Glucose unter Sauerstoffaufnahme zur Gluconsäure, während der Sauerstoff des Wassermoleküls zum einwertigen Sauerstoff im Wasserstoffperoxid reduziert wird.



Damit nicht alle TMB-Moleküle umgesetzt werden, wodurch sich die Absorption der Testlösungen trotz unterschiedlicher Hapten-Enzym-Konjugat-Konzentrationen in den Kavitäten angleichen würde, wird nach einer gewissen Zeit das Enzym mit verdünnter Schwefelsäure denaturiert, so dass es nicht mehr katalytisch aktiv ist. Durch die Protonierung der TMB-Radikalkations schlägt die Farbe von blau nach gelb um (Absorptionsmaximum bei 450 nm), (<http://www.coring.de>).

Obwohl nur sehr geringe Mengen der Probe benötigt werden, bieten die enzymatischen Bestimmungsmethoden eine hohe Präzision. Durch sogenannte Enzymgifte (Matrix) kann die Messung allerdings beeinflusst werden. Die Enzyme (POD und GOD) sind in hoher Reinheit verfügbar und auch robust. Enzymatische Bestimmungen sind gut für eine Automatisierung geeignet, wenn Serienmessungen durchgeführt werden sollen (Kuhlmann & Peschke, 1986).

In diesem Kapitel wurde die Konzentration eines Glucosesubstrats überprüft und welchen Einfluss die verschiedenen Substrat-Konzentrationen auf den ELISA haben sowie ob eine Verbesserung des Assays mit einer höheren Enzymkonzentration DDT-Hapten-GOD (3 mg anstelle von 2 mg) zu erreichen ist. Zu diesem Zweck wurden verschiedene ELISAs unter identischen Bedingungen durchgeführt, lediglich die Substrat-Konzentrationen variieren (frühere Optimierungen, s. **Tab. 6**), höher konzentriert wurden, als in **Tab. 6** beschrieben). Die Ergebnisse dieser Tests sind in **Abb. 20** dargestellt.



**Abb. 20: 4-Parameter-Standardkurven – Einfluss verschiedener Substrat-Konzentrationen auf die Assays**  
mAk DDT 1C1, 0,6 mg/mL (1.000 ng/mL); DDT-Hapten-GOD 1:8.000

Anhand der Kurvenverläufe in **Abb. 20** erkennt man, dass keine der getesteten Substrat-Konzentrationen zu einer signifikanten Verbesserung der Assays (OD-Werte und/oder Testmittelpunkte) beitragen konnte.

Die Substraterhöhung „indirekt“ die IC 50%-man durch höhere OD-Werte die Konzentration des Enzym-Tracers insgesamt erniedrigen könnte.

Der konzentrierte Substrat-Ansatz führte nur zu etwas niedrigerer Testempfindlichkeit, während die Signalintensität ungefähr gleich blieb. Für den doppelten Ansatz der Reagenzien wurde mit IC 50% (3,509 µg/L) ein dem einfachen Ansatz vergleichbarer IC 50% (4,361 µg/L) erreicht. Trotz eines kleinen Unterschiedes der IC 50%-Werte war es nicht gelungen, durch die Konzentration des Substrates eine Verbesserung des Assays zu erreichen, deswegen wurden diese Versuche nicht weiter verfolgt.

#### 1.2.2.4 Bestimmung von Kreuzreaktivitäten im Enzym Tracer-Format

Die Ergebnisse für Kreuzreaktivitäten (% CR), die mit dem mAk Lib 5-25 im entsprechenden Enzym Tracer-Format für die DDT-Isomere erzielt wurden, sind in den **Tab. 16** aufgeführt (Vergleich zwischen Literatur und eigenen Ergebnissen). (Siehe auch **Abb. B2 (A)/(B)/(C), Anhang, Teil B.**)

Die DDT-Standardkurven (40 mM PBS, 0,01-10.000 µg/L) wurden unter Verwendung von 4-Parametergleichung in SOFTmax<sup>®</sup> Pro ausgewertet.

**Tab. 16: Vergleich der Werte aus Literatur und eigener Ergebnisse - Kreuzreaktivitäten (% CR) mit mAk Lib 5-25**

Enzym Tracer-Format-ELISA mit DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD  
**Bedingungen für die Immunoreagenzien** (detaillierte Testbedingungen sind in **Tab. 6** und **Tab. 7** dargestellt):  
 mAk Lib 5-25, 500 ng/mL für DDT-Hapten-HRP und 250 ng/mL für DDT-Hapten-GOD  
 n.d. = nicht durchgeführt

Analyt	mAk Lib 5-25	mAk Lib 5-25	
	Abad et al., 1997	Eigene Ergebnisse	
	DDT-Hapten-HRP	DDT-Hapten-HRP	DDT-Hapten-GOD
<i>o,p'</i> -DDT	48,2	25	35
<i>p,p'</i> -DDT	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<i>o,p'</i> -DDD	52,7	n.d.	n.d.
<i>p,p'</i> -DDD	135,8	n.d.	n.d.
<i>o,p'</i> -DDE	22,5	n.d.	n.d.
<i>p,p'</i> -DDE	83,1	n.d.	n.d.

Hier zeigte sich, dass mAk Lib 5-25 mit DDT-Hapten-HRP in beiden Fällen (Literatur und eigene Ergebnisse) sensitiver für *o,p'*-Isomere als für *p,p'*-Isomere ist. Dies gilt für beide Enzym Tracer-Formate, unabhängig vom Enzym.

Die Enzym Tracer-Konjugate (DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD) wurden in kompetitiven ELISAs mit den neu entwickelten anti-DDT mAks getestet und in **Tab. 17** bzw. **Tab. 18** dargestellt.

**Tab. 17: Testmittelpunkte [ $\mu\text{g/L}$ ] und Kreuzreaktivitäten (% CR) von DDT-Isomeren und -Metaboliten im Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP) mit den neu entwickelten anti-DDT mAks**

**Bedingungen für die Immunoreagenzien** (detaillierte Testbedingungen sind in **Tab. 6** und **Tab. 7** dargestellt):

mAk DDT 1C1 (Rat IgG2b, ), 300 ng/mL

mAk DDT 7C12 (Rat IgG2a, ), 125 ng/mL

mAk DDT 1B2 (Rat IgG2a, ), 250 ng/mL

DDT-Hapten-HRP 1:8.000 (für mAk DDT 1C1, mAk DDT 7C12) und 1:1.000 (für mAk DDT 1B2).

mAk	mAk DDT 1C1		mAk DDT 7C12		mAk DDT 1B2	
DDT-Hapten-HRP						
Analyt	IC 50% [ $\mu\text{g/L}$ ]	% CR	IC 50% [ $\mu\text{g/L}$ ]	% CR	IC 50% [ $\mu\text{g/L}$ ]	% CR
<i>o,p'</i> -DDT	1,0 $\pm$ 0,3 (n=12)	100	2,4 $\pm$ 1,7 (n=3)	71	10.000	0,01
<i>p,p'</i> -DDT	4,6 $\pm$ 0,8 (n=5)	23	0,5 $\pm$ 0,2 (n=10)	100	4,2 $\pm$ 1,6 (n=9)	100
<i>o,p'</i> -DDD	3,6	23	6	11	415,2	1
<i>p,p'</i> -DDD	54,7	2	0,8	90	32,3	19
<i>o,p'</i> -DDE	3	32	28,9	5	10.000	0,01
<i>p,p'</i> -DDE	26,2	6	3,5	37	186,5	4
<i>p,p'</i> -DDA	10.000	0,01	10.000	0,01	10.000	0,01
DDT-Hapten	0,5	102	0,3	88	0,9	395

**Tab. 18: Testmittelpunkte [ $\mu\text{g/L}$ ] und Kreuzreaktivitäten (% CR) von DDT-Isomeren und -Metaboliten im Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-GOD) mit den neu entwickelten anti-DDT mAks**

**Bedingungen für die Immunoreagenzien** (detaillierte Testbedingungen sind in **Tab. 6** und **Tab. 7** dargestellt):

mAk DDT 1C1 (Rat IgG2b, ), 600 ng/mL

mAk DDT 7C12 (Rat IgG2a, ), 300 ng/mL

mAk DDT 1B2 (Rat IgG2a, ), 1.000 ng/mL

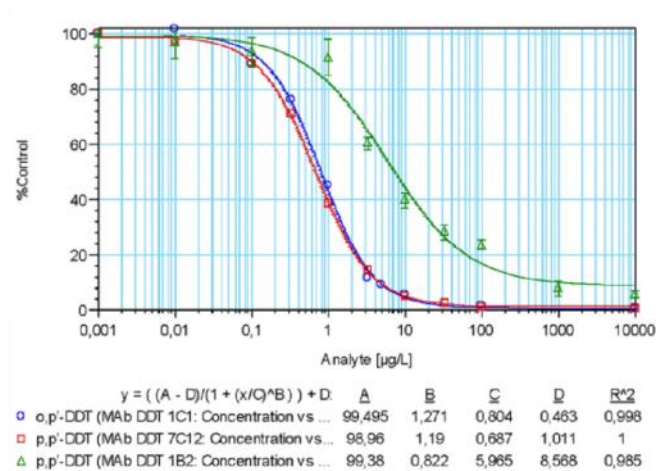
DDT-Hapten-GOD, 1:1.000 (mAk DDT 1C1, mAk DDT 7C12 und mAk DDT 1B2).

mAk	mAk DDT 1C1		mAk DDT 7C12		mAk DDT 1B2	
DDT-Hapten-GOD						
Analyt	IC 50% [ $\mu\text{g/L}$ ]	% CR	IC 50% [ $\mu\text{g/L}$ ]	% CR	IC 50% [ $\mu\text{g/L}$ ]	% CR
<i>o,p'</i> -DDT	1,6 $\pm$ 0,4 (n=8)	100	3,0 $\pm$ 1,9 (n=3)	71	10.000	0,01
<i>p,p'</i> -DDT	7,8 $\pm$ 2,7 (n=4)	27	1,4 $\pm$ 0,7 (n=4)	100	8,6 $\pm$ 2,6 (n=7)	100
<i>o,p'</i> -DDD	5,6	26	6,2	16	556,7	2
<i>p,p'</i> -DDD	144	1	1,1	90	32,5	33
<i>o,p'</i> -DDE	4,7	34	38,4	5	10.000	0,01
<i>p,p'</i> -DDE	45,7	5	4,2	47	218,9	5
<i>p,p'</i> -DDA	10.000	0,01	10.000	0,01	10.000	0,01
DDT-Hapten	1,0	115	0,7	86	2,3	238

Es zeigte sich, dass alle optimierten Tests geringfügig sensitiver wurden, wenn HRP im Enzym Tracer-Format benutzt wurde. Im Allgemeinen sind die hohen Verdünnungen von DDT-Hapten-HRP (1:8.000 mit DDT 1C1 und DDT 7C12) günstig für die Sensitivität und vermeiden unspezifische Bindungen. Dennoch hat auch GOD im Enzym Tracer-Format sehr gute und nützliche Standardkurven aufgezeigt.

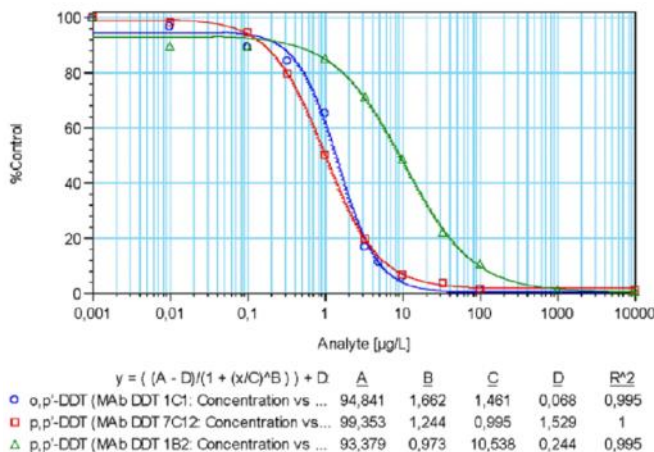
Repräsentative Standardkurven für den Haupt-Analyten (*o,p'*-DDT im Falle von mAk DDT 1C1 und *p,p'*-DDT im Falle von mAk DDT 7C12 und DDT 1B2) werden in **Abb. 21** mit DDT-Hapten-HRP und in **Abb. 22** mit DDT-Hapten-GOD aufgezeigt.

Die DDT-Standardkurven (0,01-10.000 µg/L) und Enzym Tracer-Lösung in 40 mM PBS wurden unter Verwendung von 4-Parametergleichung in SOFTmax<sup>®</sup> Pro ausgewertet.



**Abb. 21: Optimierte Standardkurven (% Control) im Enzym Tracer-Format mit DDT-Hapten-HRP**

- ( ) *o,p'*-DDT (n=2) mit mAk DDT 1C1 (300 ng/mL).
- ( ) *p,p'*-DDT (n=2) mit mAk DDT 7C12 (125 ng/mL).
- ( ) *p,p'*-DDT (n=4) mit mAk DDT 1B2 (250 ng/mL).



**Abb. 22:** Optimierte Standardkurven (% Control) im Enzym Tracer-Format mit DDT-Hapten-GOD

- ( ) *o,p'*-DDT (n=2) mit mAk DDT 1C1 (600 ng/mL).
- ( ) *p,p'*-DDT (n=2) mit mAk DDT 7C12 (300 ng/mL).
- ( ) *p,p'*-DDT (n=4) mit mAk DDT 1B2 (1.000 ng/mL).

Der mAk DDT 1C1 zeigte mit DDT-Hapten-HRP (**Abb. 21**; **Tab. 17**) einen IC 50%-Wert für *o,p'*-DDT von  $1,0 \pm 0,3 \mu\text{g/L}$  (n=12) in einem Messbereich von ca. 0,2 bis 4  $\mu\text{g/L}$  (90-10% Control) an.

Mit DDT-Hapten-GOD (**Abb. 22**; **Tab. 18**) lagen die Werte für IC 50% für *o,p'*-DDT bei  $1,6 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$  (n=8) in einem Messbereich von ca. 0,3 bis 5  $\mu\text{g/L}$  (90-10% Control). Die Muster für Kreuzreaktionen für DDT-Isomere und -Metaboliten waren unabhängig vom Enzym (**Tab. 17**; **Tab. 18**).

Der mAk DDT 1C1 zeigte im allgemeinen einen höheren % CR für *o,p'*-Isomere an. Die Selektivität von mAk DDT 7C12 war für *p,p'*-Isomere (**Tab. 17**; **Tab. 18**) am besten. Man erhielt den besten Testmittelpunkt für *p,p'*-DDT unter Anwendung von DDT-Hapten-HRP ( $0,5 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$  (n=10)). Der Messbereich für die Tests lag bei ca. 0,2 bis 4  $\mu\text{g/L}$  (90-10% Control) (**Abb. 21**).

Unter Anwendung von GOD im Enzym Tracer-Format war der IC 50%-Wert für *p,p'*-DDT  $1,4 \pm 0,7 \mu\text{g/L}$  (n=4); der Messbereich lag bei 0,2 bis 5  $\mu\text{g/L}$  (90-10% Control) (**Abb. 22**).

Zusätzliche entsprechende % CR gab es mit beiden Enzymen *p,p'*-DDD (ca. 90%), *o,p'*-DDT (ca. 70%), *p,p'*-DDE (ca. 40%) und *o,p'*-DDD (**Tab. 17**; **Tab. 18**).

Der selektivste Test, wie bereits im Coating Antigen-Format dargestellt, war mit mAk DDT 1B2, unabhängig von dem Enzym, das benutzt wurde.

Der optimierte Test mit DDT-Hapten-HRP zeigt einen IC 50%-Wert von  $4,2 \pm 1,6 \mu\text{g/L}$  ( $n=9$ ) für *p,p'*-DDT an mit einem Messbereich von ca. 1 bis 50  $\mu\text{g/L}$  (**Abb. 21**). Mit GOD im Enzym Tracer-Format gibt der Test einen IC 50%-Wert für *p,p'*-DDT von  $8,6 \pm 2,6 \mu\text{g/L}$  ( $n=7$ ) an mit einem Messbereich von ca. 2 bis 100  $\mu\text{g/L}$  (90-10% Control).

Wenn die zwei Formate verglichen werden, kann abschließend gesagt werden, dass beide ELISA-Formate für den empfindlichen (DDT 1C1, DDT 7C12) und selektiven (DDT 1B2) Nachweis von DDT-Isomeren geeignet sind. Alle Ergebnisse der Kreuzreaktionen im Enzym Tracer-Format waren den im Coating Antigen-Format erhaltenen sehr ähnlich, da sich Kreuzreaktivitäten nicht mit ELISA-Formaten ändern, zumindest dann nicht, wenn das eingesetzte Hapten identisch ist.

Im Coating Antigen-Format zeigten die erhaltenen Tests im Vergleich zum Enzym Tracer-Format im Allgemeinen höhere ODs an, jedoch waren die Testmittelpunkte nicht so gut wie im Enzym Tracer-Format.

Für das Insektizid DDT mit seinen zwei isomeren Formen *p,p'*-DDT und *o,p'*-DDT konnten mit den neu entwickelten anti-DDT mAks Standardkurven mit Testmittelpunkten im unteren ppb-Bereich erzielt werden.

Der für Trinkwasser innerhalb der EU geltende Richtwert mit 0,1  $\mu\text{g/L}$  für die Einzelsubstanz (EC Drinking Water Directive, 1998) kann noch nicht mit ausreichender Messsicherheit erfasst werden. Sedimente und Oberflächenwasser sollten aber mit diesem Messbereich analysiert werden können.

#### 1.2.2.5 Lösungsmittelverträglichkeit

Da DDT in unterschiedlichen Matrices analysiert werden soll, ist es wichtig, die Verträglichkeit mit verschiedenen Lösungsmitteln zu bestimmen.

DDT hat nur eine sehr geringe Löslichkeit in Wasser (5,5  $\mu\text{g/L}$  bei 20 °C). Daher ist ein geringer Anteil von Lösungsmitteln in den entsprechenden Standards ebenfalls von Vorteil. Es musste ein organisches Lösungsmittel gefunden werden, in dem sich die Analyte lösen und das den ELISA möglichst wenig beeinflusst.

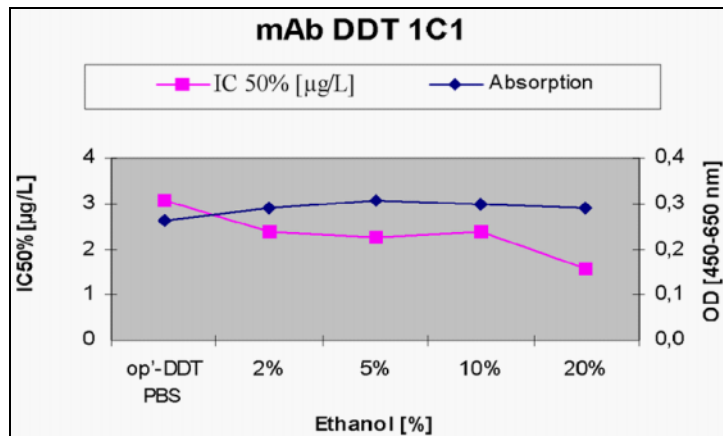
Als Lösungsmittel wurden Ethanol, Methanol, Aceton, n-Hexan, Acetonitril und Dichlormethan getestet. Hierzu wurden die Standards in unterschiedlichen %-Anteilen der jeweiligen Lösungsmittel angesetzt (z.B. 1%, 2% bis 50% in 40 mM PBS) und im

Enzym Tracer-Format getestet. Auf jeder MP wurde außerdem eine Standardkurve in 40 mM PBS als Referenz getestet.

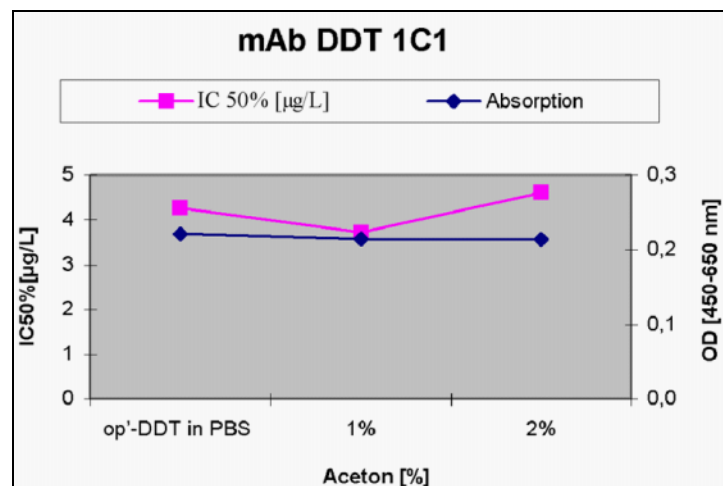
Diese Untersuchungen wurden mit dem **mAb DDT 1C1** (500 ng/mL) und mit DDT-Hapten-HRP (1:4.000) durchgeführt. Der getestete Analyt war entsprechend der *o,p*-DDT (Stammlösung: 1 mg/mL in Ethanol).

Bei einem Lösungsmittelanteil von 20% konnten nur mit Ethanol auswertbare Ergebnisse erhalten werden (**Abb. 23 (A)**). Die anderen getesteten organischen Lösungsmittel in höheren Konzentrationen erwiesen sich als ungeeignet, da sie den ELISA sehr stark beeinflussten.

Die DDT-Standardkurven (40 mM PBS, 0,01-10.000 µg/L) wurden unter Verwendung von 4-Parametergleichung in SOFTmax<sup>®</sup> Pro ausgewertet.

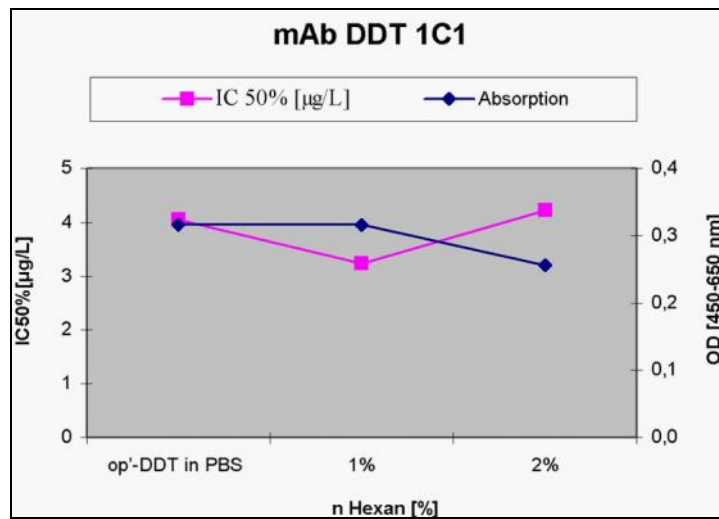


(A)

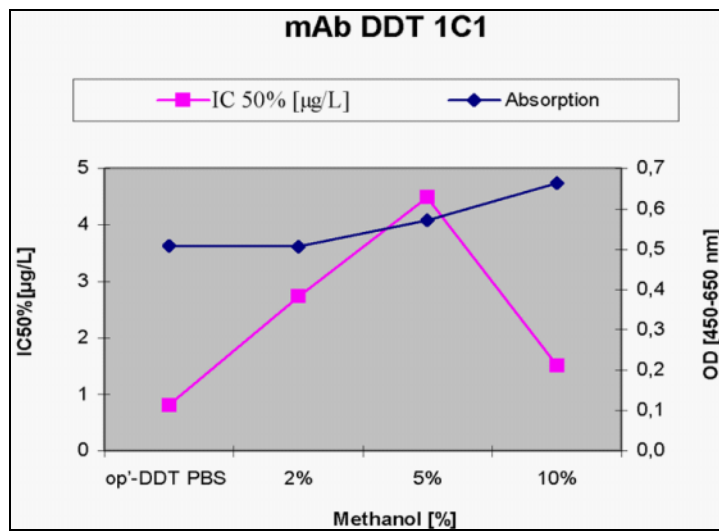


(B)

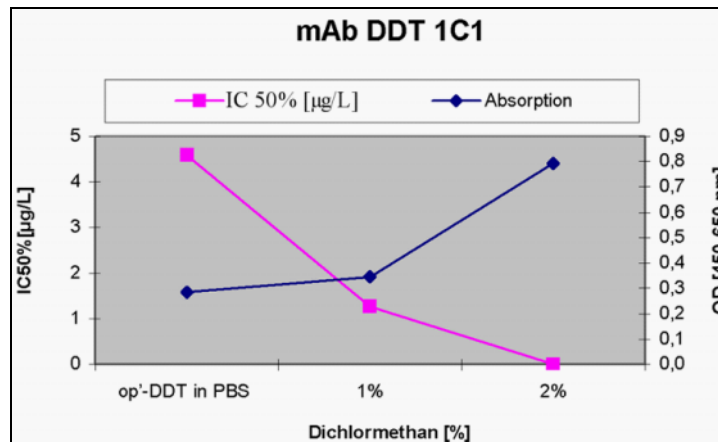




(C)



(D)



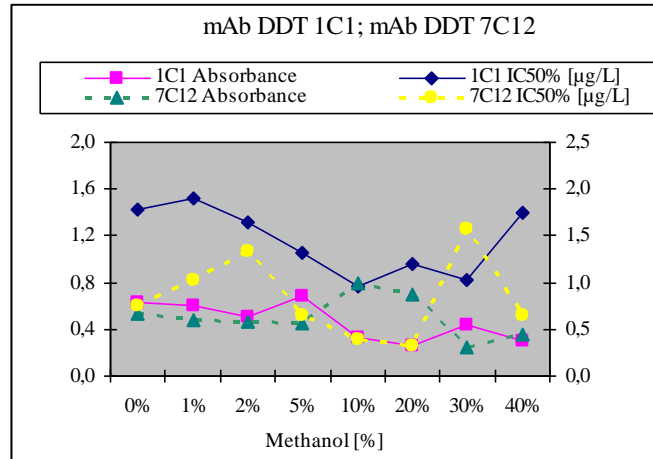
(E)

**Abb. 23: Lösungsmittelverträglichkeit im Enzym Tracer-Format-ELISA** (DDT-Hapten-HRP, 1:4.000) mit mAk DDT 1C1 (500 ng/mL), *o,p'*-DDT  
 ( ) IC 50% [µg/L]  
 ( ) OD [450-650 nm]  
**(A)** Ethanol (2, 5, 10 und 20%)  
**(B)** Aceton (1 und 2%)  
**(C)** n-Hexan (1 und 2%)  
**(D)** Methanol (2, 5 und 10%)  
**(E)** Dichlormethan (1% und 2%)

Aceton und n-Hexan (**Abb. 23 (B)**; **Abb. 23 (C)**) konnten bis 2% eingesetzt werden und mit Methanol und Dichlormethan (**Abb. 23 (D)**; **Abb. 23 (E)**) war bereits bei 1% eine Beeinträchtigung des Assays zu verzeichnen.

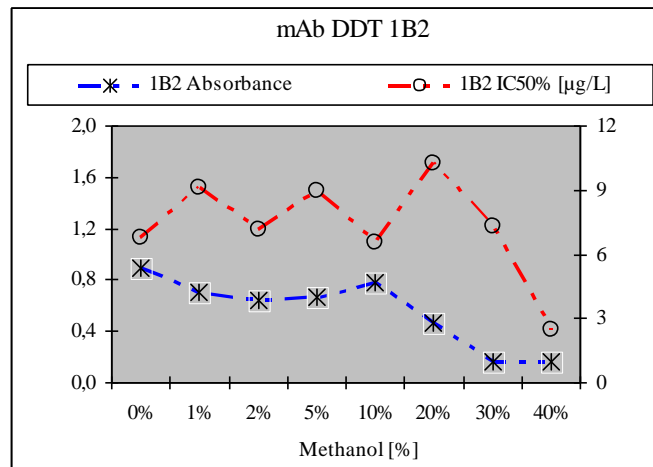
Ethanol und Aceton wurden laut Literatur (Botchkareva et al., 2003) im Chemiluminescent ELISA auch mit einer guten Verträglichkeit des Assays getestet.

Der mAk DDT 1C1 wurde noch einmal in neuen ELISA-Versuchen zusammen mit mAks DDT 7C12 und DDT 1B2 mit organischen Lösungsmitteln in unterschiedlichen Konzentrationen getestet (**Abb. 24 (A)**/(**B**)/(**C**)/(**D**)).



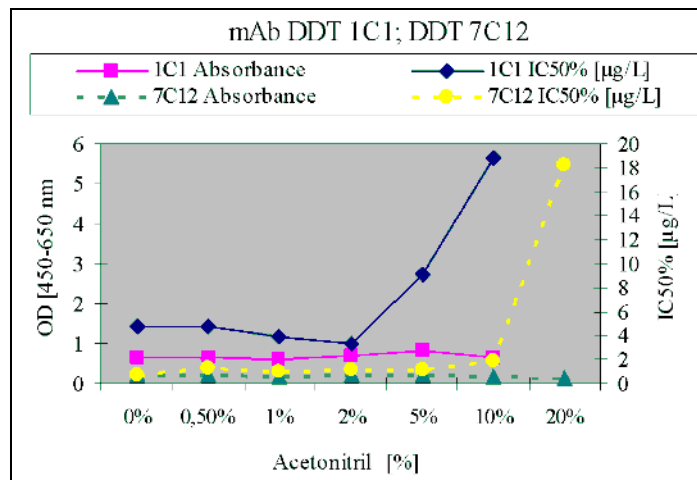
**(A)**

- ( ) mAk DDT 1C1 (500 ng/mL), OD [450-650 nm]
- ( ) mAk DDT 1C1 (500 ng/mL), IC 50% [µg/L]
- ( ) mAk DDT 7C12 (125 ng/mL), OD [450-650 nm]
- ( ) mAk DDT 7C12 (125 ng/mL), IC 50% [µg/L]



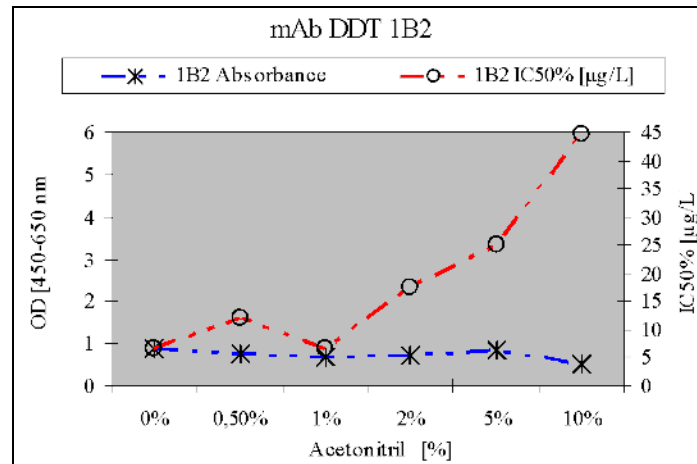
**(B)**

- (\*) mAk DDT 1B2 (250 ng/mL), OD [450-650 nm]
- ( ) mAk DDT 1B2 (250 ng/mL), IC 50% [µg/L]



(C)

- (\*) mAk DDT 1C1 (500 ng/mL), OD [450-650 nm]
- ( ) mAk DDT 1C1 (500 ng/mL), IC 50% [µg/L]
- (\*) mAk DDT 7C12 (125 ng/mL), OD [450-650 nm]
- ( ) mAk DDT 7C12 (125 ng/mL), IC 50% [µg/L]



(D)

- (\*) mAk DDT 1B2 (250 ng/mL), OD [450-650 nm]
- ( ) mAk DDT 1B2 (250 ng/mL), IC 50% [µg/L]

**Abb. 24: Lösungsmittelverträglichkeit im Enzym Tracer-Format-ELISA**

(DDT-Hapten-HRP, 1:4.000 für mAks DDT 1C1, DDT 7C12 und 1:8.000 für DDT 1B2), *o,p'*-DDT (mAk DDT 1C1); *p,p'*-DDT (mAks DDT 7C12 und DDT 1B2)

(A) Methanol (0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 und 40%), mAks DDT 1C1 und DDT 7C12

(B) Methanol (0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 und 40%), mAk DDT 1B2

(C) Acetonitril (0, 0,5, 1, 2, 5, 10 und 20%), mAks DDT 1C1 und DDT 7C12

(D) Acetonitril (0, 0,5, 1, 2, 5, und 10%), mAk DDT 1B2

Die **Abb. 24** und **Tab. B5 (Anhang, Teil B)** stellen die durchgeführten Lösungsmittel-Verträglichkeitstests mit 40 mM PBS, 5, 10, 20, 30 und 40% Methanol (MeOH) und 2, 5 und 10% Acetonitril (ACN) für anti-DDT mAks: DDT 1C1, DDT 7C12 und DDT

1B2 aller verwendeten ELISAs (A, B, C und D-Werte) dar. Die Haupt-Analyten (*o,p'*-DDT für mAk DDT 1C1 und *p,p'*-DDT für mAks DDT 7C12 und DDT 1B2) wurden in 40 mM PBS, angesetzt.

Es wurden für alle Testverfahren maximale Toleranzen für MeOH und ACN mit 10% für mAks DDT mit weniger störendem Einfluss auf den ELISA außer 1B2 (erwies sich als sehr lösungsmittelsensibel) bestimmt. In der Literatur (Botchkareva et al., 2003) wird nachgewiesen, dass im Chemiluminescent ELISA eine Konzentration zwischen 5-20% MeOH für mAk DDT Lib 5-25 auch keinen Einfluss auf  $RLU_{max}$ , aber auf IC 50% hat.

Generell sind die oben getesteten Lösungsmittel, außer Methanol, keine ideale Lösung (keine Gleichmäßigkeit für alle drei anti-DDT mAks), da bei großem Anteil von Lösungsmitteln die OD-Werte stark erniedrigt wurden und es zu starken Schwankungen kam, wobei sich die IC 50%-Werte zum Teil um das 10fache erhöhten.

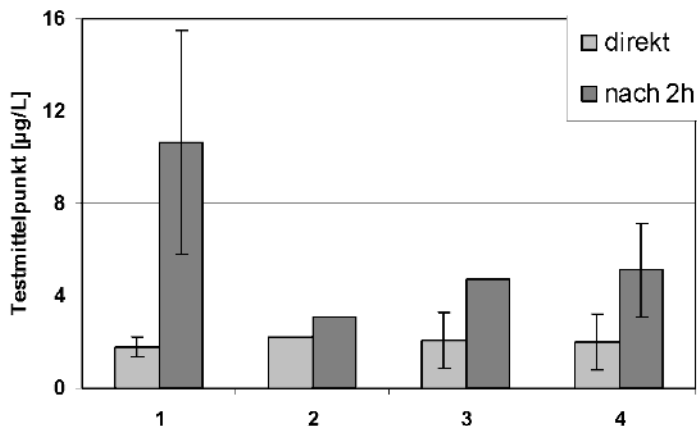
Um für die anti-DDT mAks einen möglichst geeigneten Lösungsmittelanteil zu finden, wurden weitere Experimente durchgeführt.

#### **1.2.2.6 Auswirkung der Inkubationszeit auf den Standardansatz**

Bei der Analyse von DDT-Isomeren und -Metaboliten muss die niedrige Wasserlöslichkeit dieser Substanzen berücksichtigt werden sowie die Neigung, an Oberflächen zu adsorbieren.

DDT ist in Wasser fast unlöslich. Es ist ein schwerflüchtiger chlorierter Kohlenwasserstoff. Es wurden Adsorptionswirkungen auf der Oberfläche von Gläschen beobachtet. Die Zeitspanne zwischen dem Ansetzen der Standards und der Anwendung im ELISA war sehr kritisch.

**Abb. 25** zeigt beispielhaft die Ergebnisse für den ELISA (Enzym Tracer- i-  
rekt“ nach dem Ansetzen der Standards auf die MP .



**Abb. 25: ELISA in Enzym Tracer-Format**

(DDT-Hapten-HRP, 1:4.000) mit mAk DDT 1C1 (500 ng/mL);

DDT-Standards direkt nach dem Ansatz

Pipettierung auf die MP 2 h nach dem Ansatz

1 40 mM PBS

2 10% (v/v) Isopropanol/0,01% Tween in 40 mM PBS

3 10% (v/v) Isopropanol/DMSO 4:1 in 40 mM PBS

4 10% (v/v) Isopropanol in 40 mM PBS

Die relativ hohen Standardabweichungen in den IC 50%-Werten können auch aufgrund dieses Problems entstehen, da alle Standardkurven für die Optimierung und Bestimmung von CR % in 40 mM PBS eingerichtet wurden. Dies ist insbesondere dann ein Problem, wenn mehrere Platten an einem Tag verarbeitet werden.

Es zeigt sich eine Veränderung bei den Testmittelpunkten [µg/L], wenn die Standards direkt vor dem Absaugen auf der MP eingerichtet wurden (hellgrau) und nach 2 Stunden (dunkelgrau). Je länger die Standards in den Gläschen gehalten werden, umso weniger sensibel sind die Standardkurven, da die DDT-Standards auf der Oberfläche des Glases haften und daher die Bindung an anti-DDT mAks während der Anwendung im ELISA nicht mehr möglich ist.

Hohe Standardabweichungen der Testmittelpunkte [µg/L] wurden insbesondere dann beobachtet, wenn die Standards ca. 2 Stunden lang in den Gläschen verblieben. Die Zugabe von Lösungen oder Mischungen von Lösungen und die Zugabe von Detergens, die als Beispiele ausgewählt wurden, zeigten eindeutig eine Verminderung dieser Wirkung. Es wurden Experimente durchgeführt, um diese Wirkung zu verringern bzw. um die beste Kombination zwischen Lösungen, oberflächenaktiven Stoffen etc. zu finden.

## 2 AQUA-OPTOSENSOR

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse dienen dem Ziel, DDT in Wasserproben und Sedimenten mit einem automatisierten optischen Immunosensor (AQUA-OPTOSENSOR) nachzuweisen. Da der Immunosensor bisher nur bedingt vor Ort eingesetzt werden kann (benötigt Stromversorgung und die Zeit zum Zusammensetzen des Sensor-Chips), wurden die Messungen im Labor durchgeführt.

Bei der Optimierung der Einzeltests wurden Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate (anti-DDT mAks DDT Oyster<sup>®</sup>-645-Konjugate mit verschiedenen Konzentrationen und mit verschiedenen Abstoppszeiten, wie in 2.3 Material und Methoden beschrieben), Coating Antigene, der Einfluss verschiedener Lösungsmittel-Konzentrationen sowie der Einfluss von Temperatur und Inkubationszeiten überprüft. Der Einsatz von Isopropanol wurde als ein vielversprechender Ansatz für die Anwendung dieser Immunoagenzien innerhalb des AQUA-OPTOSENSOR-Systems erkannt.

Das Coating Antigen-Format wurde für die Charakterisierung und Optimierung des AQUA-OPTOSENSOR-Systems eingesetzt.

Der Oyster<sup>®</sup>-645-Fluoreszenzfarbstoff (Denovo Biolabels) gehört zu den Cyanin-farbstoffen (z.B. Cy5, der auch zur Markierung von Biomolekülen für den optischen Immunosensor verwendet wurde, Meusel et al., 1998), die eine immer größere Bedeutung haben, da sie mit ihren Absorptions- und Emissionsmaxima den gesamten Bereich des sichtbaren Spektrums von Blau bis Nah-Infrarot abdecken.

Bei der Herstellung der Antikörper-Konjugate war zu berücksichtigen, dass bei höheren Belegungsdichten mit Fluoreszenzfarbstoff eine Verminderung der Aktivität des Antikörpers auftreten kann. Die Aktivität der mit dem Oyster<sup>®</sup>-645-Fluoreszenzfarbstoff markierten anti-DDT mAks wurde im Coating Antigen-Format-ELISA überprüft (wie in **Tab. 4** beschrieben). Anhand der Ergebnisse des anti-DDT mAks konnte im Vergleich zu denen der fluoreszenzmarkierten anti-DDT mAks die Aktivität der anti-DDT mAks nach der Kopplung ermittelt werden (Daten nicht angezeigt). Es wurde keine Inaktivierung des anti-DDT mAks festgestellt.

### 2.1 Analyse von *p,p'*-DDT und *o,p'*-DDT mit AQUA-OPTOSENSOR

Verglichen mit den anti-DDT mAks im Immunoassay-Format zeigen anti-DDT mAk Oyster<sup>®</sup>-645-Konjugate in dem optischen Immunosensor vergleichbare Ergebnisse für die zugehörigen DDT-Isomere.

Die anti-DDT mAks 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645 (1,5 mg/mL), 1B2-Oyster<sup>®</sup>-645 (1,3 mg/mL) und 1C1-Oyster<sup>®</sup>-645 (0,6 mg/mL) wurden optimiert und für die Messungen gekennzeichnet.

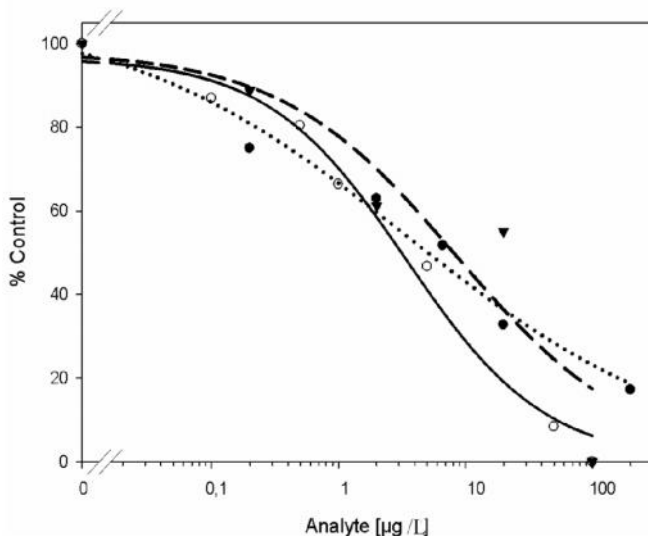
**Tab. B6 (Anhang, Teil B)** enthält die Ergebnisse mit AQUA-OPTOSENSOR-System (Slope-Werte von verschiedenen *p,p'*-DDT dotiert und verschiedenen mAks DDT 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645 Konzentrationen) in MS-Excel ausgewertet.

Als Coating Antigen wurde DDT-Hapten KLH (3,1 mg/mL) auf der PMMA-Oberfläche des Sensor-Prismas absorbiert und die Standardkurven für *p,p'*-DDT und *o,p'*-DDT mit dem AQUA-OPTOSENSOR optimiert.

Die genaue Versuchsdurchführung zur Charakterisierung des anti-DDT mAks Oyster<sup>®</sup>-645 erfolgte wie unter 2.5.1.1 Material und Methoden beschrieben. Da die Lösungsmittel den Test beeinflussen, wurde darauf geachtet, dass in jedem Ansatz die gleiche Isopropanolkonzentration (5%) enthalten war. Als Vergleich wurde für jede Standardkurve ein Ansatz ohne Analyt (Nullstandard) gemessen. Es wurden oft zwei bis vier Bestimmungen (Sensor-Chip) durchgeführt, aus denen sich Mittelwert und Standardabweichungen errechnen ließen. Die nächsten beiden Abbildungen zeigen die Ergebnisse mit AQUA-OPTOSENSOR-System.

Die Testmittelpunkte für die analogen DDT-Isomere lagen wieder niedriger als 10 µg/L. Mit DDT 7C12 Oyster<sup>®</sup>-645 lag der IC 50% ca. bei 3 µg/L für *p,p'*-DDT und einem Messbereich von 0,3-30 µg/L; mit DDT 1B2-Oyster<sup>®</sup>-645 lag der IC 50% bei ca. 9 µg/L für *p,p'*-DDT und im Bereich von 1-100 µg/L konnte gemessen werden. Mit DDT 1C1-Oyster<sup>®</sup>-645 lag der IC 50% ca. bei 4 µg/L für *o,p'*-DDT, und die Standardkurve zeigte einen Messbereich von 0,4-100 µg/L (**Abb. 26**).





**Abb. 26: Standardkurven mit AQUA-OPTOSENSOR**

( ) *p,p'*-DDT mit anti-DDT **mAk 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645** (5 µg/mL) in 2% (w/v) BSA/40 mM PBS: A = 96,7; B = 0,8; C (IC 50% [µg/L]) = 3,4; D = 0,0; R<sup>2</sup> = 0,986.

( ) *p,p'*-DDT mit anti-DDT **mAk 1B2-Oyster<sup>®</sup>-645** (4,3 µg/mL) in 2% (w/v) BSA/40 mM PBS: A = 98,2; B = 0,6; C (IC 50% [µg/L]) = 8,6; D = 0,0; R<sup>2</sup> = 0,878.

( ) *o,p'*-DDT mit anti-DDT **mAk 1C1-Oyster<sup>®</sup>-645** (1,2 µg/mL) in 2% BSA/40 mM PBS: A = 108,0; B = 0,4; C (IC 50% [µg/L]) = 3,5; D = 0,0; R<sup>2</sup> = 0,980.

Das DDT-Hapten-KLH-Konjugat (3,1 mg/mL) wurde als Coating Antigen auf das PMMA Prisma pipettiert. DDT-Standards wurden in 5% (v/v) Isopropanol in 40 mM PBS angesetzt und die anti-DDT mAks Oyster<sup>®</sup>-645 und DDT-Standards wurden für die Messung zusammen für 30 min/22 °C inkubiert.

Die Standardkurven wurden mit Software SigmaPlot, 4-Parametergleichung:

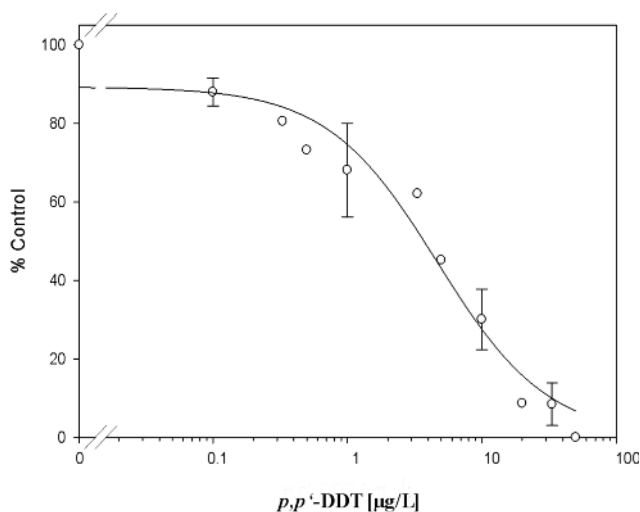
$$y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D, \text{ ausgewertet.}$$

Im Gegensatz zum Immunoassay können im AQUA-OPTOSENSOR die Standards und/oder Proben nur nacheinander gemessen werden. Der anti-DDT mAk 7C12 Oyster<sup>®</sup>-645 wurde gewählt, um Messungen der Standards an verschiedenen Tagen zu erhalten (**Abb. 27**).

Hierbei wurden alle Bedingungen konstant gehalten, außer für die Mischungen von anti-DDT mAk 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645 und Analyte, die jeden Tag neu angesetzt wurden. Um zu bestätigen, dass die Ergebnisse der Messung von der vorher gemessenen Konzentration unabhängig sind, wurden die Prüftests ausgeführt, indem die Abfolge der Messung der Analyt-Konzentration geändert wurde: Die Sensor-Chips wurden von niedriger zu höherer Analyt-Konzentration und umgekehrt gemessen. Die Ergebnisse mit dem AQUA-

OPTOSENSOR-System ([mV/s] und IC 50%) zeigten eine gute Reproduzierbarkeit dieser Messungen an verschiedenen Tagen mit Standardabweichungen von ca. 10% (Abb. 27).

Die Standardabweichung für die Immunosensor-Ergebnisse wurde bei identischen Tests für verschiedene Tage gezeigt (n = 2-5).



**Abb. 27: Messungen an verschiedenen Tagen (Standardkurven mit AQUA-OPTOSENSOR)**

( )  $p,p'$ -DDT mit anti-DDT **mAk 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645** (0,7  $\mu\text{g/mL}$ ) in 2% (w/v) BSA/40 mM PBS: A = 89,3; B = 1,1; C (IC 50%;  $\mu\text{g/L}$ ) = 4,7; D = 0,0;  $R^2 = 0,964$  (n = 2-5).

Für die an verschiedenen Tagen durchgeführten Tests wurde ein neuer Batch von anti-DDT mAks 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645 Konjugaten verwendet und nochmals optimiert. Die Standardkurve verschob sich leicht nach rechts mit IC 50% von 4,7  $\mu\text{g/L}$  und einem Messbereich von 1 bis 30  $\mu\text{g/L}$ .

Da die Kapazität des Sensor-Chips nur 200  $\mu\text{L}$  umfasst, musste zuerst das Volumen der Reagenzien für den Test optimiert werden. Vorversuche hatten gezeigt, dass durch ca. 0,5  $\mu\text{L}$  Coating Antigen auf das Prisma keine uniformen und reproduzierbaren Beschichtungen (Peaks) erreicht werden können, sondern deutliches Auftreten von Hintergrund-Signalen erfolgte.

Nach den Vorversuchen wurde das Volumen des Coating Antigens auf 0,1  $\mu\text{L}$  reduziert. Dass die Spots auf dem Prisma nicht immer gleichmäßig pipettiert werden konnten, ist auf die manuelle Pipettierung zurückzuführen.

Um dadurch bedingte Ungleichmäßigkeiten zu vermeiden, wurden oft Mehrfachbestimmungen durchgeführt, aber mit Rücksicht auf die Anzahl der Sensor-Chips. Allerdings kann die Ungleichmäßigkeit der Werte durch an gleichen oder verschiedenen Tagen durchgeführte Tests auf äußere Faktoren wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit und zufälligen Fehlern bei der manuellen Pipettierung (von Coating auf Prismas) oder verschiedene Sensor-Chip-Produktionen zurückzuführen sein.

In der vorliegenden Arbeit spielten die Optimierungen der Inkubationszeiten dabei eine wichtige Rolle. Es wurde versucht minimale Inkubationszeiten zu erreichen. Ein kompletter Test mit Inkubationszeiten wurde auf ca. 35 min optimiert.

Eine Schwierigkeit beim Transfer der in MP optimierten ELISAs auf AQUA-OPTOSENSOR liegt im Auftreten von unspezifischen Hintergrund-Signalen. Für die Optimierung im AQUA-OPTOSENSOR war ein wichtiger Punkt die Verwendung von PBS mit Zusatz von 2% BSA als Absättigungsreagenz. Verschiedene Autoren haben sich mit diesem Thema beschäftigt und beschreiben die positiven Effekte von Absättigungsschritten (Tween-20, BSA u.a.) auf die Signalintensität bzw. Reduzierung des Hintergrundes (Mauriz et al., 2006; Mak et al., 2006). Diese Effekte könnten allerdings auch auf die Inkubationszeiten zurückzuführen sein.

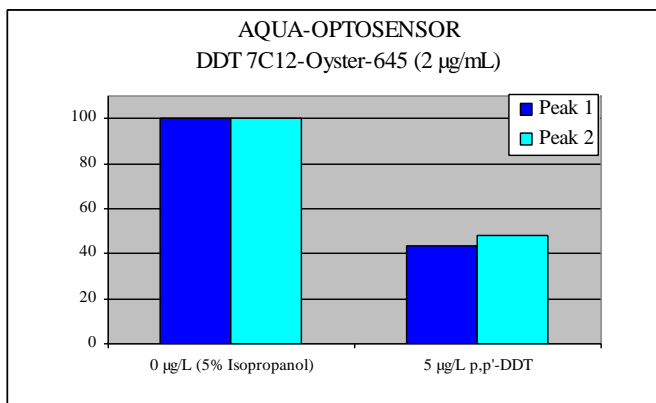
Im Laufe der Optimierungen wurden anti-DDT mAks Oyster<sup>®</sup>-645-Konzentrationen anhand von verschiedenen Kopplungsansätzen mit Abstoppszeit nach 5 min, 10 min, 15 min und nach 20 min getestet. Durch diese Studie erwies sich, dass man allgemein mit Antikörperansätzen nach 5 min Abstoppszeit die besten Ergebnisse erreichen konnte.

Die **Abb. B3, B4 (A)/(B)** und **Abb. B5 (Anhang, Teil B)** zeigen Messungen der Standardkurven mit anti-DDT mAks 1C1-Oyster<sup>®</sup>-645 (IC 50% = 11,5 µg/L); 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645 ((A) IC 50% = 4,6 und (B) IC 50% = 2,12) und Standardkurven mit 1B2-Oyster<sup>®</sup>-645 (IC 50% = 10,42), die in MS-Excel mit 4-Parametergleichung:  $y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$  ausgewertet wurden. Die **Tab. B7 (Anhang, Teil B)** (DDT 1C1-Oyster<sup>®</sup>-645); **Tab. B8 (A)/(B) (Anhang, Teil B)** (DDT 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645) und **Tab. B9 (Anhang, Teil B)** (DDT 1B2-Oyster<sup>®</sup>-645) zeigen die Auswertungen der Messungen mit Anzeigen des Peaks vom linearen Bereich (Slope [mV/s]-Werte), die Cursor Positionieranzeigen A und B am Anfang und am Ende des Peaks (Position-Werte) und die Cursor-Positionen [sec] A und B, die maximale Zeit, in welcher die Steigung linear ist (Time-Werte), **Abb. 28 (B)/(C)** (s. auch **Abb. 13**).

## 2.2 Testversuche zum Nachweis von zwei Spots auf das Prisma

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem Test überprüft, ob der Parallelnachweis von DDT realisierbar ist. Nach der Optimierung der Einzeltests wurde für das AQUA-OPTOSENSOR-System ein Multi-Spot-Ansatz unter denselben Testbedingungen überprüft. Dazu wurden zwei Spots vom Coating Antigen (DDT-Hapten-KLH) auf ein Prisma pipettiert und im mAk DDT 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645 eingesetzt.

Es zeigte sich, dass beide Peaks 0“-Wert, 5% Isopropanol (v/v)/40 mM PBS und in 40 mM PBS dotiert 5 µg/L *p,p'*-DDT/5% Isopropanol (v/v)) miteinander vergleichbar sind und dass in beiden Ansätzen die Inhibition gleich ca. 50% ist, **Abb. 28 (A)/(B)/(C)**.



(A)



(B)

(C)

**Abb. 28: AQUA-OPTOSENSOR mit mAk DDT 7C12-Oyster-645; zwei Peaks auf einem Sensor-Chip**

(A) MS-Excel-Auswertung in % Control; Peaks - 40 mM PBS/5% Isopropanol (v/v)/40 mM PBS und Peaks - 40 mM PBS dotiert 5 µg/L *p,p'*-DDT/5% Isopropanol (v/v)/40 mM PBS

(B) Peaks - 40 mM PBS/5% Isopropanol (v/v)/40 mM PBS

(C) Peaks - 40 mM PBS dotiert 5 µg/L *p,p'*-DDT/5% Isopropanol (v/v)/40 mM PBS

Das DDT-Hapten-KLH-Konjugat (3,1 mg/mL) wurde als Coating Antigen auf das Prisma pipettiert und der mAk DDT 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645 (2 µg/mL in 2% (w/v) BSA in 40 mM PBS eingesetzt.

Die im Rahmen dieser Arbeit überprüften Nachweise von zwei Spots auf das Prisma waren für die Nachweisverfahren von DDT von größter Bedeutung. Dieser erste Erfolg sollte es zudem zukünftig ermöglichen, weitere Tests (z.B. Multianalyt-Ansatz) zu integrieren.

### **3 Analysen von Wasserproben mit ELISA und AQUA-OPTOSENSOR**

Um beispielhaft den Einsatz des AQUA-OPTOSENSORS in der Praxis zu demonstrieren, wurden Wasserproben und Sedimente analysiert.

Eines der Ziele dieser Arbeit liegt darin, die DDT-Belastung von Wasserproben mit Hilfe des ELISAs und zusätzlich mit dem AQUA-OPTOSENSOR zu untersuchen.

Das Coating Antigen ELISA-Format wurde erstens zum besseren Vergleich mit dem AQUA-OPTOSENSOR-System gewählt und zweitens, um den Matrixeinfluss auf die Enzyme des Enzym Tracers zu vermeiden.

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Analyse des DDT in Wasserproben beschrieben (z.B. SPE mit GC: Barcelo, 1991; SPE mit HPLC: Zhou et al., 2006; E-ROD Assay in *Allium cepa* als potentialer Biomarker: Fatima & Ahmad, 2006 u.a.). Die verwendeten Techniken benötigen relativ große Mengen an Lösungsmitteln. Durch GC/MS (PSWE und SBSE)-Methoden wurde demonstriert, dass Lösungsmittel wie ACN auch in einem reduzierten Einsatz (Wasser:ACN 75:25 (v/v)), verwendet werden konnten (Rodil & Popp, 2006).

Im nächsten Kapitel werden Untersuchungen mit Wasserproben ohne Einsatz von Lösungsmitteln (ELISA) und einem Einsatz von 5% Isopropanol (v/v)/40 mM PBS (AQUA-OPTOSENSOR) vorgestellt.

#### **3.1 Wasserproben aus München**

Mit optimierten Bedingungen für DDT wurden Wasserproben aus München (Riemer See, Isar und Bach im Englischen Garten) zum Vergleich zwischen beiden Test-Formaten analysiert. Die Messungen mit mAk DDT 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645 im ELISA (**Abb. B6, Anhang, Teil B**) und im Immunosensor-Format sind in **Tab. 19** in % Control und in **Abb. B7 (Anhang, Teil B)** die Standardkurven (Slope [mV/s]) im Über-

blick gezeigt. Die Wasserproben wurden mit  $p,p'$ -DDT dotiert, um die Reproduzierbarkeit der Konzentration zu testen.

Es wurden jeweils mAk DDT 7C12 (125 ng/mL in 40 mM PBS für ELISA-Format) und mAk DDT 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645 (2 µg/mL in 2% (w/v) BSA in 40 mM PBS für AQUA-OPTOSENSOR-System) angewendet. Als Coating Antigen wurde das DDT-Hapten-OVA ¼-Konjugat (1 µg/mL in 50 mM Carbonatpuffer, pH 9,6) für ELISA-Format und DDT-Hapten-KLH (3,1 mg/mL in 40 mM PBS) für das AQUA-OPTOSENSOR-System eingesetzt. Für  $p,p'$ -DDT wurden 5% (v/v) Isopropanol in 40 mM PBS Standardkurven für den Immunosensor angesetzt und in 40 mM PBS für das MP-Format.

**Tab. 19: Wasserproben aus verschiedenen Gewässern in München - % Control im ELISA (Coating Antigen-Format) und AQUA-OPTOSENSOR mit mAk DDT 7C12 und mAk DDT 7C12-Oyster-645**

mAk DDT 7C12 / mAk DDT 7C12-Oyster-645				
PBS / Sample	$p,p'$ -DDT [µg/L] dotiert	OD [450-650 nm] ELISA	% Control ELISA	% Control AQUA-OPTOSENSOR
<b>PBS</b> (n=3)	0	1,090 ± 0,075	100	100
	1	0,667 ± 0,035	61 ± 5,0	72
	2	0,632 ± 0,051	58 ± 2,3	53
<b>Riemer See</b> pH 8,4	0	0,944	100	100
	1	0,676	72	79
	2	0,585	62	52
<b>Isar</b> pH 8,1	0	1,051	100	100
	1	0,917	87	82
	2	0,591	56	53
<b>Bach im Englischen Garten</b> pH 8,3	0	1,146	100	100
	1	0,701	61	76
	2	0,728	64	55

Bei der Messung von Wasserproben aus München mit ELISA und AQUA-OPTOSENSOR-System zeigen die % Control-Werte beider Formate vergleichbare Ergebnisse. Einen Unterschied von ca. 10% zeigen die Werte des Bachs im Englischen Garten, bei denen sich die % Control-Werte im ELISA bei 1 µg/L  $p,p'$ -DDT von 61% und bei 2 µg/L von 64% und im Immunosensor % Control-Werte bei 1 µg/L  $p,p'$ -DDT von 76% und bei 2 µg/L von 55% ergeben.

In der **Tab. 20** wurden die errechneten dotierten Konzentrationen detektiert [µg/L] mit Slopes [mV/s] bzw. OD [450-650 nm] und mit Wiederfindungsraten in [%] (Recovery) für Messungen von Wasserproben aus München (Riemer See, Isar und Bach im Englischen Garten) im ELISA- und Immunosensor-Format zusammengefasst.

**Tab. 20: Wasserproben aus verschiedenen Gewässern in München –****AQUA-OPTOSENSOR und im ELISA (Coating Antigen-Format)**

mit mAk DDT 7C12 und mAk DDT 7C12-Oyster-645

<sup>1</sup> *p,p'*-DDT Standardkurven wurden in 5% (v/v) Isopropanol in 40 mM PBS angesetzt.<sup>2</sup> *p,p'*-DDT Standardkurven wurden in 40 mM PBS angesetzt.<sup>3</sup> außerhalb des Messbereiches

n.d. = nicht durchgeführt

Wasserproben	AQUA-OPTOSENSOR mAk DDT 7C12 - Oyster <sup>®</sup> -645 <sup>1</sup>				ELISA mAk DDT 7C12 <sup>2</sup>		
	<i>p,p'</i> -DDT [µg/L] dotiert	Slope [mV/s]	Detected [µg/L]	Recovery [%]	OD [450-650 nm]	Detected [µg/L]	Recovery [%]
<b>Riemer See</b> pH 8,4	0	10,4	< 1	- <sup>3</sup>	0,944 ± 0,034	- <sup>3</sup>	- <sup>3</sup>
	0,1	9,5	< 1	- <sup>3</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
	1	8,8	< 1	- <sup>3</sup>	0,640 ± 0,035	1,09 ± 0,14	109
	2	n.d.	n.d.	n.d.	0,506 ± 0,027	1,75 ± 0,16	88
	3,33	n.d.	n.d.	n.d.	0,414 ± 0,050	2,44 ± 0,45	73
	10	3,1	8,9	89	0,055 ± 0,002	> 8	- <sup>3</sup>
<b>Isar</b> pH 8,1	33,33	0,7	> 30	- <sup>3</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
	0	9,2	< 1	- <sup>3</sup>	1,051 ± 0,042	- <sup>3</sup>	- <sup>3</sup>
	0,1	8,5	< 1	- <sup>3</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
	1	7,3	1,2	124	0,828 ± 0,008	0,46 ± 0,04	46
	2	n.d.	n.d.	n.d.	0,633 ± 0,028	1,52 ± 0,18	76
	3,33	n.d.	n.d.	n.d.	0,464 ± 0,063	3,00 ± 0,67	90
<b>Bach im Englischen Garten</b> pH 8,3	10	3,1	8,9	89	0,071 ± 0,014	> 8	- <sup>3</sup>
	33,33	0,7	> 30	- <sup>3</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
	0	9,6	< 1	- <sup>3</sup>	1,664 ± 0,122	- <sup>3</sup>	- <sup>3</sup>
	0,1	8,5	< 1	- <sup>3</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
	0,33	8,3	0,4	121	n.d.	n.d.	n.d.
	1	7,1	1,4	140	0,853 ± 0,030	1,10 ± 0,07	110
<b>Bach im Englischen Garten</b> pH 8,3	2	n.d.	n.d.	n.d.	0,579 ± 0,022	1,93 ± 0,09	97
	3,33	6,0	2,6	78	0,399 ± 0,039	2,94 ± 0,29	88
	10	4,0	8,5	85	0,113 ± 0,019	> 8	- <sup>3</sup>
	33,33	0,6	> 30	- <sup>3</sup>	n.d.	n.d.	n.d.

Im Messbereich der beiden immunochemischen Formate zeigten die meisten Ergebnisse, Ausnahme Isar, Wiederfindungsraten im Bereich von 80-120%, **Tab. 20**. Zusätzlich wurden dotierte Proben mit DDT-Konzentrationen unter oder über dem Messbereich der Formate als solche bestimmt. Der Messbereich ist jedoch sehr begrenzt; insbesondere im ELISA umfasst er nur eine Zehnerpotenz. Für Sortierzwecke ist dies von Vorteil, denn es kann zur Unterscheidung kontaminierter Proben von nicht kontaminierten Proben bei einer bestimmten Schwellen-Konzentration verwendet werden (z. B. MAC – maximal zulässige Konzentration).

In der ersten Studie mit Mustern von Oberflächenwasser konnte nachgewiesen werden, dass beide immunochemischen Plattformen in der Lage sind, DDT in dem niedrigen ppb-Bereich zu analysieren. Dies ist der Fall, obwohl diese verschiedenen Plattformen

a) unterschiedliche optische Erkennungsmethoden (Absorptionsvermögen versus Fluoreszenz) und b) nicht markierte versus markierte anti-DDT mAks verwenden.

AQUA-OPTOSENSOR wurde für die Analyse von Flusswasserproben aus Nairobi angewendet. Auf der Basis der physikalisch-chemischen Eigenschaften von DDT-Isomeren und -Metaboliten können weitere Matrizes für immunochemische Analysen der Böden und Ablagerungen möglich werden. Für die Umweltproben muss eine schnelle Extraktionsmethode durchgeführt werden, gefolgt von einer Verdünnung des organisch löslichen Extrakts.

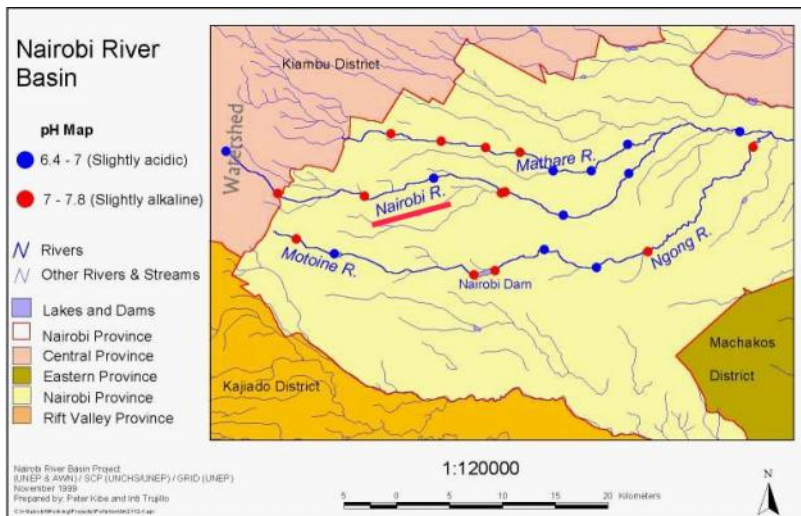
Zusätzliche Anwendungen werden in der Analyse von DDT-Isomeren und -Metaboliten in humanen Milchfetten und humanem Serum gesehen, wo diese Verbindungen akkumulieren (ATSDR, 2002).

Über den Einsatz von anti-DDT mAks in Immunosensoren liegt noch nicht viel Literatur vor. In Arbeiten von Mauriz et al. (2006 a/b)), die quasi zeitgleich zu den hier beschriebenen Arbeiten durchgeführt wurden, wurde der mAks DDT Lib 5-25 in einem SPR-optischen Immunosensor für die Analyse von DDT in Wasserproben eingesetzt. Nach diesen Erkenntnissen sind die LOD-Werte (20 ng/L), die mit dem Immunosensor erreicht wurden, im Vergleich zu den Messungen mit dem ELISA besser. Der AQUA-OPTOSENSOR ermöglicht Messungen von einer Probe nach 2 min, wohingegen die Detektion mit dem SPR-Immunosensor für simultane Messungen von zwei Proben nach 12 min erreicht ist.

### **3.2 Wasserproben vom Nairobi-Fluss**

In diesem Kapitel werden Ergebnisse zu Wasserproben aus dem Nairobi-Fluss (**Abb. 29**) von verschiedenen Gebieten (s. Kapitel 1.7 Material und Methoden) vorgestellt.





**Abb. 29: Karte der Nairobi-Provinz**  
[www.unep.org/roa/Nairobi\\_River/Webpages](http://www.unep.org/roa/Nairobi_River/Webpages)

Die erste Probennahme erfolgte an der Quelle (Ondire lower). Bis zur Stadt ergab sich die folgende Reihenfolge: Ondire upper, Nyongara lower, Loretto, Kirichwa, Museum, Chiromo, Globe Roundabout, Racecourse, Shauri Moyo, Outer Ring Road. Die Nummerierung von 1 bis 11 zeigt den Ablauf der Entnahme der Wasserproben. Die Proben: Outer Ring Road 1st (11) / Outer Ring Road 2nd (11) und Ondire lower 1st (1) / Ondire lower 2st (1) wurden innerhalb weniger Wochen zwei Mal entnommen. In der **Abb. 30** kann man die Unterschiede in der Wasserqualität im Verlauf des Flusses erkennen.

Im Gebiet des unteren Nairobi-Flusses kann man mit einem höheren Grad der Kontamination des Wassers mit Schadstoffen rechnen. In diesem Fall werden in Umweltproben die Ergebnisse häufig durch schwierige Matrices und die unbekannt Anzahl der darin vorliegenden Schadstoffe erschwert.

Ein besonderes Umwelt- und Gesundheitsproblem in den Nicht-EU-Staaten ist die starke Auswirkung von Agrochemikalien, wie chlorhaltige Verbindungen, die sich im Wasser und Sedimenten langfristig anreichern. Das ist zurzeit ein wichtiges Thema. Es wird versucht, diese Wasserverschmutzungen zu vermeiden. Ein positives Beispiel ist das AQUA-SCREEN-Projekt, eine internationale Kooperation, deren gemeinsames Interesse in der Überwachung der Wasserqualität im Nairobi-Fluss liegt.



**(A) Ondire lower**



**(B) Ondire upper**



**(C) Globe Roundabout**



(D) Shauri Moyo

**Abb. 30: Nairobi-Fluss – verschiedene Probennahmepunkte**

Die Wasserproben und Sedimente wurden im September 2005 entnommen. Für die Durchführungen und die allgemeinen Optimierungen von Immunoreagenzien gelten hier die Vorschriften, wie in **Tab. 5**, **Tab. 6**, **Tab. 7** und Kapitel 2.5.1.1 Material und Methoden erläutert.

Die Messungen wurden im ELISA-Format (Coating Antigen- und Enzym Tracer-Format) und im Immunosensor-Format (AQUA-OPTOSENSOR) durchgeführt.

### **3.2.1 Tests in ELISA-Formaten**

Bei den Messungen wurden in den beiden ELISA-Formaten die mAks DDT 7C12 und DDT 1B2 miteinander verglichen. Jede Wasserprobe wurde vierfach gemessen und bezog sich auf die *p,p'*-DDT Standardkurve mit 40 mM PBS.

#### ***Coating Antigen-Format***

In diesem ersten Format wurden Messungen der Wasserproben aus dem Nairobi-Fluss von zwei verschiedenen Personen mit zeitlichem Abstand durchgeführt (Coating Antigen-Format 1\* und Coating Antigen-Format 2\*). **Tab. 21** zeigt die Assays mit mAks DDT 7C12 (250 ng/mL) und DDT 1B2 (500 ng/mL) mit den zugehörigen Ergebnissen und Standardabweichungen. Die Messbereiche aus den Standardkurven ( $\mu\text{g/L}$ ) werden für beide Untersuchungen aufgeführt.

**Tab. 21: ELISA im Coating Antigen-Format mit den Wasserproben aus dem Nairobi-Fluss**  
n.d. = nicht durchgeführt

Wasserproben	Coating Antigen 1*		Coating Antigen 2*	
	mAk DDT 7C12 Messbereich: 0,3 - 5 µg/L	mAk DDT 1B2 Messbereich: 2 - 10 µg/L	mAk DDT 7C12 Messbereich: 0,1 - 10 µg/L	mAk DDT 1B2 Messbereich: 0,3 - 20 µg/L
<b>Ondire lower 1st (1)</b>	n.d.	n.d.	<0,1	0,64 ± 0,00
<b>Ondire lower 2nd (1)</b>	<0,1	<0,1	0,17 ± 0,00	0,250 ± 0,195
<b>Ondire upper (2)</b>	<0,1	1,222 ± 0,817	0,329 ± 0,240	0,813 ± 0,283
<b>Nyongara lower (3)</b>	<0,1	1,345 ± 0,678	n.d.	n.d.
<b>Loretto (4)</b>	0,743 ± 0,623	3,282 ± 0,645	0,689 ± 0,141	0,882 ± 0,255
<b>Kirichwa (5)</b>	0,235 ± 0,0	<0,1	0,41 ± 0,061	0,935 ± 0,227
<b>Museum (6)</b>	0,533 ± 0,104	2,669 ± 0,498	0,462 ± 0,022	1,064 ± 0,068
<b>Chiromo (7)</b>	0,521 ± 0,274	1,570 ± 0,00	0,564 ± 0,194	1,005 ± 0,369
<b>Globe Roundabout (8)</b>	2,324 ± 0,065	7,837 ± 0,300	1,997 ± 0,163	5,219 ± 1,277
<b>Racecourse (9)</b>	2,273 ± 0,160	7,312 ± 0,718	3,283 ± 0,301	8,817 ± 2,642
<b>Shauri Moyo (10)</b>	2,546 ± 0,076	8,755 ± 0,089	2,656 ± 0,752	9,709 ± 0,835
<b>Outer Ring Road 1st (11)</b>	n.d.	n.d.	2,907 ± 0,872	11,362 ± 1,929
<b>Outer Ring Road 2nd (11)</b>	2,364 ± 0,219	8,193 ± 0,949	2,535 ± 0,198	8,756 ± 0,437

Die Unterschiede zwischen Coating Antigen 1\* und Coating Antigen 2\* sind klein. Auffallend ist, dass der mAk DDT 1B2 in den beiden Assays deutlich mehr als der mAk DDT 7C12 an DDT-Konzentration in den Wasserproben erkennt (**Abb. B8**, und **Abb. B9; Anhang, Teil B**). Die allgemein höheren Werte können noch nicht richtig begründet werden. Diese Resultate können an dem Sensitivitäts- oder Spezifitätsunterschied zwischen beiden anti-DDT mAks, an die Kreuzreaktivität der eingesetzten Antikörper zu den Metaboliten oder an verschiedenen Matrixeffekten, die zu großen Konzentrationsunterschieden führen, liegen. Dies zieht Unsicherheiten in der Konzentrationsbestimmung nach sich, aber man erkennt eine Tendenz und eine Reproduzierbarkeit in den durchgeführten Messungen. Diese allgemeine Tendenz unterstützt die Vermutung, dass die ersten drei Wasserproben dabei keine DDT-Belastung oder einen niedrigeren Matrixeffekt zeigen. Für die Wasserproben 4 bis 11 zeigten die Ergebnisse eine systematische Steigerung, was auf eine DDT-Konzentration oder einen höheren Matrixeffekt hinweisen kann. Den störenden Einfluss von Kontaminationen oder Matrixeffekten konnte man in der Erhöhung der Werte noch deutlicher von der Wasserprobe 8 zu 11 sehen.

Die Standardabweichungen in diesen Assays sind beim mittleren Messbereich durchaus tolerabel.

Die ELISA-Methode kann man sehr gut als Scening-Methode einsetzen, und es besteht keine Notwendigkeit zur Probenvorbereitung für die getesteten Wasserproben.



**Enzym Tracer-Format**

In einer nächsten Stufe des ELISAs wurde das Enzym Tracer-Format (Enzym-Tracer-HRP und Enzym-Tracer-GOD) durchgeführt. In der **Tab. 22** und in der **Abb. B10 (A)/(B) (Anhang, Teil B)** sind die Ergebnisse aus diesem Format zusammengefasst.

**Tab. 22: ELISA im Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD) mit den Wasserproben aus dem Nairobi-Fluss**

Wasserproben	Enzyme-Tracer-HRP		Enzyme-Tracer-GOD	
	mAk DDT 7C12	mAk DDT 1B2	mAk DDT 7C12	mAk DDT 1B2
	Messbereich: 0,1 -10 µg/L	Messbereich: 0,5 -40 µg/L	Messbereich: 0,2 -10 µg/L	Messbereich: 0,3 -20 µg/L
<b>Ondire lower 1st (1)</b>	0,114 ± 0,045	0,596 ± 0,048	Range	0,265 ± 0,373
<b>Ondire lower 2nd (1)</b>	0,215 ± 0,066	0,984 ± 0,013	Range	0,106 ± 0,149
<b>Ondire upper (2)</b>	0,169 ± 0,021	1,099 ± 0,033	Range	0,259 ± 0,038
<b>Loretto (4)</b>	0,706 ± 0,061	1,137 ± 0,038	0,169 ± 0,053	0,315 ± 0,305
<b>Kirichwa (5)</b>	0,507 ± 0,023	1,076 ± 0,188	0,076 ± 0,068	0,284 ± 0,063
<b>Museum (6)</b>	0,506 ± 0,027	1,242 ± 0,113	0,053 ± 0,068	0,213 ± 0,159
<b>Chiromo (7)</b>	0,703 ± 0,023	1,452 ± 0,124	0,108 ± 0,059	0,362 ± 0,233
<b>Globe Roundabout (8)</b>	2,2 ± 0,143	7,456 ± 0,185	0,677 ± 0,045	2,246 ± 0,091
<b>Racecourse (9)</b>	3,135 ± 0,079	14,025 ± 0,335	1,008 ± 0,044	5,793 ± 0,332
<b>Shauri Moyo (10)</b>	2,747 ± 0,047	11,111 ± 0,178	0,710 ± 0,042	1,855 ± 0,305
<b>Outer Ring Road 1st (11)</b>	3,414 ± 0,070	15,637 ± 0,373	1,257 ± 0,038	7,015 ± 0,296
<b>Outer Ring Road 2nd (11)</b>	4,806 ± 0,738	25,51 ± 4,183	1,917 ± 0,169	14,626 ± 0,367

Die Resultate zeigen, dass die Tendenz für die Wasserproben von 1 zu 11 absolut vergleichbar zu dem Coating Antigen-Format ist. Wie in dem Coating Antigen-Format sieht man hier eine deutliche Erhöhung der Werte von der Wasserprobe 8 zu 11. Auch die Tendenz zu den Ergebnissen mit Enzym-Tracer-HRP und Enzym-Tracer-GOD ist gleich. Hier kann lediglich die Tendenz nachvollzogen werden, dass die Ergebnisse mit dem Enzym-Tracer-HRP und Enzym-Tracer-GOD für "Outer Ring Road" 1st und "Outer Ring Road" 2nd mit beiden mAks (DDT 7C12 und DDT 1B2) deutlich ansteigen. Es ist zu beobachten, dass die Werte mit mAk DDT 1B2 sowohl im Coating Antigen-Format als auch im Enzym Tracer-Format wesentlich höher als mit mAk DDT 7C12 sind. Dies deutet daraufhin, dass die DDT-Konzentration aufgrund des Einflusses auf den anti-DDT mAk von Matrixeffekten überbestimmt wird.

Es ist bekannt, dass die Enzymaktivität an den verschiedenen Matrices solche Schwankungen in Assays bei der Wasseranalyse ermöglicht (Schütz et al., 1997).

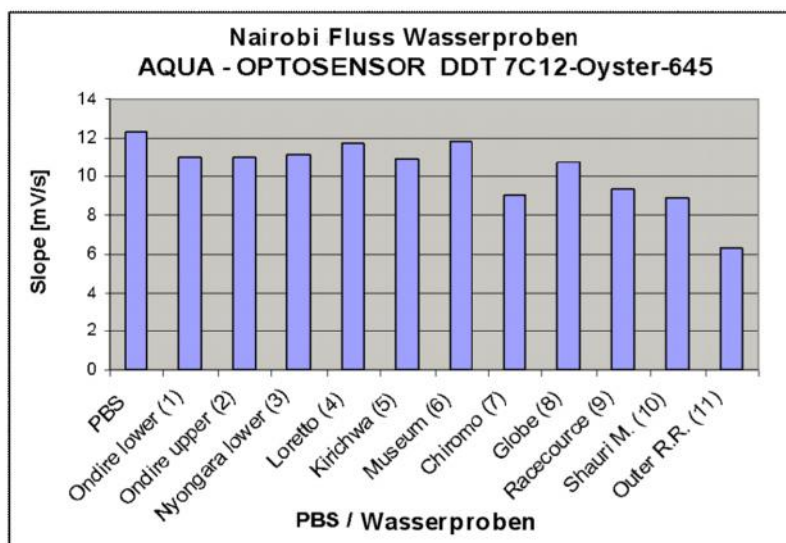
Diese ersten Ergebnisse mit Wasserproben aus dem Nairobi-Fluss in ELISA-Formaten können zunächst nur eine Tendenz aufzeigen, da die Referenzanalytik-Messwerte nicht bekannt sind. Vergleicht man die Trends der Kontaminationen im Coating Antigen- mit dem im Enzym Tracer-Format, so ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung.

### 3.2.2 Tests mit AQUA-OPTOSENSOR-System

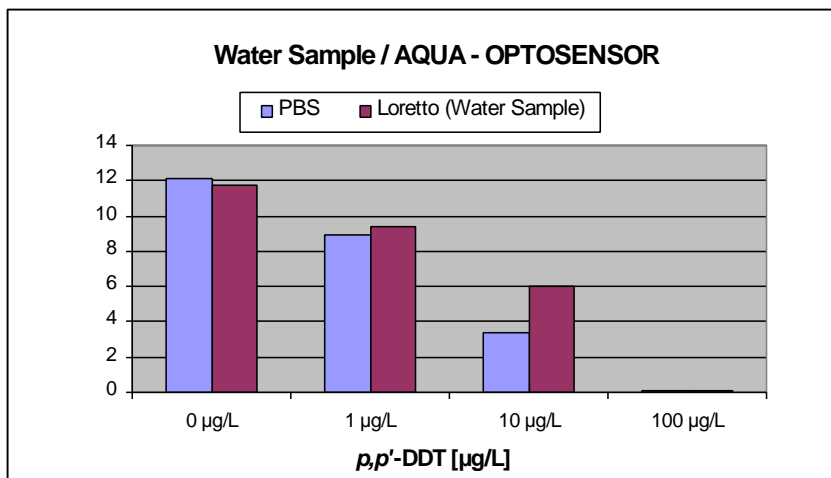
Die Wasserproben vom Nairobi-Fluss wurden einer Screening-Analyse unterzogen, um mögliche DDT-Konzentrationen zu ermitteln.

Die anti-DDT mAKs wurden mit DDT-Standards (30 min in den Glasreagenzien) gemischt. Um zu vermeiden, dass DDT an den Glasoberflächen bindet, wurden die DDT-Standards in 40 mM PBS/5% (v/v) Isopropanol angesetzt. Hierdurch wird eine Verfälschung der Empfindlichkeit der Tests vermieden.

In der **Abb. 31 (A)** sind die Messungen von Wasserproben aus dem Nairobi-Fluss mit AQUA-OPTOSENSOR dargestellt. Für die ersten Versuche wurde nur der mAk DDT 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645 getestet. Zusätzlich wurde die Loretto-Wasserprobe (4) mit *p,p'*-DDT-Konzentrationen dotiert und gemessen, **Abb. 31 (B)**.



(A)



(B)

**Abb. 31: AQUA-OPTOSENSOR mit Wasserproben aus dem Nairobi-Fluss mit mAk DDT 7C12-Oyster-645 (0,75  $\mu\text{g/mL}$ )**

(A) Wasserproben von 1 bis 11 und 40 mM PBS/5% (v/v) Isopropanol  
 (B) Dotierte Wasserprobe (0, 1, 10, 100  $\mu\text{g/L}$   $p,p'$ -DDT) „Loretto“ (4)

Die Versuche bei den untersuchten Proben mittels AQUA-OPTOSENSOR zeigen bis zur Probe 6 (Museum) ziemlich gleichmäßige Signale (Slope [mV/s]) mit Wasserproben aus dem Nairobi-Fluss. Ab Probe 7 (Chiromo) sind Inhibitionen mit den Wasserproben zu erkennen. Dies stimmt weitgehend mit den Ergebnissen auf den ELISA-Formaten überein. Es scheint eine Erniedrigung des Slope-Wertes (AQUA-OPTOSENSOR) aufzutreten. Lediglich Probe 7 (Chiromo) ist im ELISA-Format noch vergleichbar mit den vorangegangenen Proben (s. **Tab. 21**, **Tab. 22**). Eventuell wurden die Proben Chiromo (7) und Globe Roundabout (8) im AQUA-OPTOSENSOR vertauscht (z.B bei der Probenentnahme oder bei den Messungen der Proben). Die letzte Wasserprobe (Outer Ring Road (11) zeigt im Immunosensor-System und auch im ELISA-Format deutlich die höchste Konzentration. Allerdings war nicht mit Sicherheit zu erkennen, ob es sich um eine kontaminierte Wasserprobe handelte oder mit großer Wahrscheinlichkeit auf Matrixeffekte zurückzuführen ist.

Das höhere Mess-Signal bei der dotierten Wasserprobe Loretto (10  $\mu\text{g/L}$   $p,p'$ -DDT), welches mit dem Mess-Signal mit 40 mM PBS verglichen wurde, konnte nicht genau erklärt werden (**Abb. 31**).

Die **Abb. B11 (Anhang, Teil B)** zeigt eine Standardkurve, bei der verschiedene Zeitnahmen der Wasserproben mit DDT 7C12-Oyster-645 getestet wurden. Die vier Wasserproben vom 16.09.05 (Chiromo (7), Globe Roundabout (8), Racecourse (9) und Shauri M. (10)) zeigen ein niedrigeres Mess-Signal, welches zwischen 1 und 3  $\mu\text{g/L}$   $p,p'$ -DDT liegt.

Im Allgemeinen sind die Testmittelpunkte bei den Messungen im AQUA-OPTOSENSOR-System höher als bei den Messungen im MP-Format. Bei dem Vergleich der Messungen im ELISA und AQUA-OPTOSENSOR müssen unterschiedliche Verhältnisse berücksichtigt werden (wie z.B. deutlich höhere Konzentrationen von anti-DDT mAbs und Coating Antigen im Immunosensor als im ELISA-Format). Da sich jedoch die Tendenz der Ergebnisse im Laufe dieser Versuche bestätigt hat, ist eine sehr gute Übereinstimmung (Ausnahme Probe Chiromo (7) und Globe Roundabout (8)) zwischen dem AQUA-OPTOSENSOR und dem ELISA-Format zu sehen.

#### **4 Analysen von Sedimenten**

Oberflächengewässer sind mit einer Vielzahl von anorganischen und organischen Umweltchemikalien belastet. Durch Produktion, Transport, Verwendung oder auch Förderung von Rohstoffen gelangen Schadstoffe in die Gewässer. Schadstoffe wie DDT, welche sich im Wasser nur schwer lösen, adsorbieren als lipophile Kontaminante an Partikel und sedimentieren mit diesen zum Boden des Gewässers, und selbst bei einer Verbesserung der Wasserqualität bleibt diese Kontamination des Sediments erhalten. Insgesamt wird der ökologisch aktive Teil der Sedimente aus wenigen Zentimetern der Oberfläche (ca. 2 cm) gebildet, während die tiefer gelegenen Schichten in dieser Hinsicht eher passiv sind. In Sedimenten zeigten DDT bzw. DDT-Metaboliten eine sehr lange Halbwertszeit.

Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit war die Belastung der Sedimente mit DDT von verschiedenen Probeentnahmestellen. Für die Untersuchungen von Nairobi-Fluss-Sedimenten ( Ondire upper“, Museum“ und Outer Ring Road“) wurden aufgrund ihrer komplexen Matrix Eluate und verschiedene Extrakte geprüft. Im Laufe der Methodenentwicklungsphase wurde festgestellt, dass das Clean-up-Verfahren unter Verwendung von Kieselgel für eine gute Abtrennung der Matrix nötig war. Eine genaue Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte mit Clean-up-Verfahren ist in **Abb. 15** (s. Seite 48) enthalten.



#### **4.1 ELISA-Format und GC/MS**

Die drei Sedimente wurden sowohl mit **ELISA** als auch mit **GC/MS** untersucht (**Tab. 23**, **Tab. 24**, und **Tab. 25**), um die Vergleichbarkeit der über zwei verschiedene Analyseverfahren erhaltenen Konzentrationsdaten zu beurteilen.

Für die ELISA-Messungen im Coating Antigen-Format wurden die Ergebnisse, die mit den Sedimenten 1:25 verdünnt wurden, für die anti-DDT mAks (DDT 1C1, DDT 7C12 und DDT 1B2) und die Standardkurve in 4% Isopropanol (v/v)/40 mM PBS verwendet. Die Messungen, die mit 1:50 und 1:100 Sedimenten verdünnt wurden, ergaben Ergebnisse ausserhalb des Messbereiches.

Für die ELISA-Messungen im Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD) wurden die Ergebnisse, die mit den Sedimenten mit 1:50 verdünnt wurden, für anti-DDT mAks (DDT 1C1, DDT 7C12 und DDT 1B2) und Standardkurve in 2% Isopropanol (v/v)/40 mM PBS verwendet. Die Messungen, die mit 1:25 und 1:100 Sedimenten verdünnt wurden, ergaben Ergebnisse ausserhalb des Messbereiches.

Von Herrn Dr. Martens wurden freundlicherweise die Messungen von Sedimenten mit GC/MS zur Verfügung gestellt. Die Probenvorbereitungen für die Messungen der Sedimente wurden ebenfalls unter seiner Anleitung und mit seiner Unterstützung ermöglicht.

**Tab. 23: Sediment-Analyse in ELISA-Format (Coating Antigen-Format und Enzym Tracer-Format) und GC/MS**

(A) **mAk DDT 1C1** – Kreuzreaktivitäten in ELISA-Format und GC-MS ng/g Bestimmungen

(B) **ELISA-Format** mit:

\* = gesamte DDT-Konzentration in ng/g

\*\* = gesamte DDT-Konzentration in ng/g erwartet mit ELISA (nach Kreuzreaktion)

\*\*\* = Verhältniszahlen ELISA erwartet laut Kreuzreaktion/GC/MS

\*\*\*\* = tatsächlich bestimmt mit ELISA in ng/g

\*\*\*\*\* = ELISA-Verhältniszwerte (ELISA tatsächlich bestimmt zu ELISA erwartet)

n.n. = nicht nachweisbar

<u>ELISA-Format</u> <u>mAk DDT 1C1</u>	<u>ELISA - Kreuzreaktivität (%CR)</u>					
	<i>o,p'</i> - <b>DDT</b>	<i>p,p'</i> - <b>DDT</b>	<i>o,p'</i> - <b>DDD</b>	<i>p,p'</i> - <b>DDD</b>	<i>o,p'</i> - <b>DDE</b>	<i>p,p'</i> - <b>DDE</b>
Coating Antigen-F.	100	75	91	12	141	13
Enzym Tracer-F. (HRP)	100	23	23	2	32	6
Enzym Tracer-F. (GOD)	100	27	26	1	34	5
<u>GC/MS</u>						
Ondire upper	<b>0,52</b>	<b>0,81</b>	<b>0,43</b>	<b>0,72</b>	n.n.	<b>1,74</b>
Museum	<b>0,89</b>	<b>2,59</b>	<b>0,55</b>	<b>1,28</b>	<b>0,23</b>	<b>2,08</b>
Outer Ring Road	<b>2,26</b>	<b>5,55</b>	<b>1,86</b>	<b>4,41</b>	<b>0,64</b>	<b>4,22</b>

(A)

<u>ELISA-Format</u> <u>mAk DDT 1C1</u>	<u>Sedimente</u>	<u>DDT</u> <u>GC/MS</u> <u>ng/g</u> <u>*</u>	<u>DDT</u> <u>ELISA</u> <u>ng/g</u> <u>**</u>	<u>ELISA</u> <u>GC/MS</u> <u>***</u>	<u>ELISA</u> <u>****</u>	<u>ELISA-</u> <u>Verhältniszwerte</u> <u>*****</u>
Coating Antigen-F.	Ondire upper	4,22	1,83	<b>0,43</b>	39,00	<b>21,30</b>
	Museum	7,62	4,08	<b>0,54</b>	20,00	<b>4,90</b>
	Outer Ring R.	18,94	10,10	<b>0,53</b>	33,00	<b>3,27</b>
Enzym Tracer-F. (HRP)	Ondire upper	4,22	0,92	<b>0,22</b>	5,00	<b>5,41</b>
	Museum	7,62	1,84	<b>0,24</b>	5,00	<b>2,72</b>
	Outer Ring R.	18,94	4,51	<b>0,24</b>	8,00	<b>1,77</b>
Enzym Tracer-F. (GOD)	Ondire upper	4,22	0,94	<b>0,22</b>	14,00	<b>14,82</b>
	Museum	7,62	1,93	<b>0,25</b>	6,00	<b>3,11</b>
	Outer Ring R.	18,94	4,71	<b>0,25</b>	9,00	<b>1,91</b>

(B)

Mit mAks DDT 1C1 im Coating Antigen-Format zeigte die Probe "Ondire upper" eine höhere Belastung (39,00 ng/g) mit DDT an. Etwas niedrigere Belastung zeigte die Probe "Outer Ring Road" (33,00 ng/g) und die geringste Belastung mit DDT lag in der Probe "Museum" (20,00 ng/g) vor. Im Enzym Tracer-Format mit DDT-Hapten-HRP wurden ziemlich gleiche Konzentrationen zwischen 5 und 8 ng/g detektiert. In diesem Format zeigten sich mit mAk DDT 1C1 niedrigere Gehalte des DDT als im Coating Antigen-

Format. Mit DDT-Hapten-GOD wurde ebenfalls die höchste Konzentration an DDT in Ondire upper“ (14,00 ng/g), dann in Outer Ring Road“ (9,00 ng/g) und am niedrigsten in Museum“ (6,00 ng/g) gefunden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der GC/MS-Untersuchungen lässt sich zusammenfassen, dass mit ELISA allgemein eine höhere Konzentration bestimmt wurde. **Tab. 23 (B)** vergleicht den Gehalt an DDT, wo eine Konzentrationserhöhung (Überbestimmung) von ca. 21% mehr im Coating Antigen-Format bei Ondire upper“ und von ca. 15% mehr im Enzym Tracer-Format bei Ondire upper“ (DDT-Hapten-GOD) festgestellt wurde.

**Tab. 24: Sediment-Analyse in ELISA-Format (Coating Antigen-Format und Enzym Tracer-Format) und GC/MS**

(A) **mAk DDT 7C12** – Kreuzreaktivitäten in ELISA-Format und GC-MS ng/g Bestimmungen

(B) **ELISA-Format** mit:

\* = gesamte DDT-Konzentration in ng/g

\*\* = gesamte DDT-Konzentration in ng/g erwartet mit ELISA (nach Kreuzreaktion)

\*\*\* = Verhältniszahlen ELISA erwartet laut Kreuzreaktion/GC/MS

\*\*\*\* = tatsächlich bestimmt mit ELISA ng/g

\*\*\*\*\* = ELISA-Verhältniszahlen (ELISA tatsächlich bestimmt zu ELISA erwartet)

n.n. = nicht nachweisbar

<u>ELISA-Format</u> <u>mAk DDT 7C12</u>	<u>ELISA - Kreuzreaktivität (%CR)</u>					
	<i>p,p'</i> - <b>DDT</b>	<i>o,p'</i> - <b>DDT</b>	<i>o,p'</i> - <b>DDD</b>	<i>p,p'</i> - <b>DDD</b>	<i>o,p'</i> - <b>DDE</b>	<i>p,p'</i> - <b>DDE</b>
Coating Antigen-F.	100	56	15	98,3	6	51
Enzym Tracer-F. (HRP)	100	71	11	90	5	37
Enzym Tracer-F. (GOD)	100	71	16	90	5	47
<u>GC/MS</u>						
Ondire upper	<b>0,81</b>	<b>0,52</b>	<b>0,43</b>	<b>0,72</b>	n.n.	<b>1,74</b>
Museum	<b>2,59</b>	<b>0,89</b>	<b>0,55</b>	<b>1,28</b>	<b>0,23</b>	<b>2,08</b>
Outer Ring Road	<b>5,55</b>	<b>2,26</b>	<b>1,86</b>	<b>4,41</b>	<b>0,64</b>	<b>4,22</b>

(A)

<u>ELISA-Format</u> <u>mAk DDT 7C12</u>	<u>Sedimente</u>	<u>DDT</u> <u>GC/MS</u> <u>ng/g</u> <u>*</u>	<u>DDT</u> <u>ELISA</u> <u>ng/g</u> <u>**</u>	<u>ELISA</u> <u>GC/MS</u> <u>***</u>	<u>ELISA</u> <u>****</u>	<u>ELISA-</u> <u>Verhältniszahlen</u> <u>*****</u>
Coating Antigen-F.	Ondire upper	4,22	2,76	<b>0,65</b>	21,00	<b>7,61</b>
	Museum	7,62	5,50	<b>0,72</b>	17,00	<b>3,09</b>
	Outer Ring R.	18,94	13,62	<b>0,72</b>	35,00	<b>2,57</b>
Enzym Tracer-F. (HRP)	Ondire upper	4,22	2,52	<b>0,60</b>	5,00	<b>1,99</b>
	Museum	7,62	5,22	<b>0,68</b>	4,00	<b>0,77</b>
	Outer Ring R.	18,94	12,92	<b>0,68</b>	11,00	<b>0,85</b>
Enzym Tracer-F. (GOD)	Ondire upper	4,22	2,71	<b>0,64</b>	2,00	<b>0,74</b>
	Museum	7,62	5,45	<b>0,72</b>	5,00	<b>0,92</b>
	Outer Ring R.	18,94	13,44	<b>0,71</b>	9,00	<b>0,67</b>

(B)

Mit mAk DDT 7C12 im Coating Antigen-Format zeigt die Probe "Outer Ring Road" eine höhere Belastung (35,00 ng/g) mit DDT an. Etwas niedrigere Belastung zeigte die Probe "Ondire upper" (21,00 ng/g) und die geringste Belastung mit DDT lag in der Probe "Museum" (17,00 ng/g) vor. Im Enzym Tracer-Format mit DDT-Hapten-HRP wurden ziemlich gleiche Konzentrationen zwischen 5 und 11 ng/g detektiert. In diesem Format zeigten sich mit mAk DDT 7C12 niedrigere Gehalte an DDT als im Coating Antigen-Format. Mit DDT-Hapten-GOD wurde die höchste Konzentration an DDT in "Outer Ring Road" (9,00 ng/g), dann in "Museum" (5,00 ng/g) und am niedrigsten in "Ondire upper" (2,00 ng/g) gefunden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der GC/MS-Untersuchungen lässt sich zusammenfassen, dass die erwarteten Verhältniszahlen für die Bestimmung von DDT mit ELISA insgesamt höher nachgewiesen wurden. Eine Konzentrationserhöhung (Überbestimmung) von über 700% zeigt sich im Coating Antigen-Format mit "Ondire upper". Bis zu 200% mehr wurde im Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP) mit "Ondire upper" nachgewiesen, **Tab 24 (B)**.

**Tab. 25: Sediment-Analyse in ELISA-Format (Coating Antigen-Format und Enzym Tracer-Format) und GC/MS**

(A) **mAk DDT 1B2** – Kreuzreaktivitäten in ELISA-Format und GC-MS ng/g

Bestimmungen

(B) **ELISA-Format** mit:

\* = gesamte DDT-Konzentration in ng/g

\*\* = gesamte DDT-Konzentration in ng/g erwartet mit ELISA (nach Kreuzreaktion)

\*\*\* = Verhältniszahlen ELISA erwartet laut Kreuzreaktion/GC/MS

\*\*\*\* = tatsächlich bestimmt mit ELISA in ng/g

\*\*\*\*\* = ELISA-Verhältniszwerte (ELISA tatsächlich bestimmt zu ELISA erwartet)

n.n. = nicht nachweisbar

<u>ELISA-Format</u> <u>mAk DDT 1B2</u>	<u>ELISA - Kreuzreaktivität (%CR)</u>					
	<i>p,p'</i> - DDT	<i>o,p'</i> - DDT	<i>o,p'</i> - DDD	<i>p,p'</i> - DDD	<i>o,p'</i> - DDE	<i>p,p'</i> - DDE
Coating Antigen-F.	100	0,1	4	65	0,1	8,3
Enzym Tracer-F. (HRP)	100	0,1	1	19	0,1	4
Enzym Tracer-F. (GOD)	100	0,1	2	33	0,1	5
<u>GC/MS</u>						
Ondire upper	<b>0,81</b>	<b>0,52</b>	<b>0,43</b>	<b>0,72</b>	-	<b>1,74</b>
Museum	<b>2,59</b>	<b>0,89</b>	<b>0,55</b>	<b>1,28</b>	<b>0,23</b>	<b>2,08</b>
Outer Ring Road	<b>5,55</b>	<b>2,26</b>	<b>1,86</b>	<b>4,41</b>	<b>0,64</b>	<b>4,22</b>

(A)

<u>ELISA-Format</u> <u>mAk DDT 1B2</u>	<u>Sedimente</u>	<u>DDT</u> <u>GC/MS ng/g</u> *	<u>DDT</u> <u>ELISA</u> <u>ng/g</u> **	<u>ELISA</u> <u>GC/MS</u> ***	<u>ELISA</u> ****	<u>ELISA-</u> <u>Verhältniszwerte</u> *****
Coating Antigen-F.	Ondire upper	4,22	1,44	<b>0,34</b>	22,00	<b>15,28</b>
	Museum	7,62	3,62	<b>0,47</b>	13,00	<b>3,59</b>
	Outer Ring R.	18,94	8,84	<b>0,47</b>	30,00	<b>3,39</b>
Enzym Tracer-F. (HRP)	Ondire upper	4,22	1,02	<b>0,24</b>	17,00	<b>16,65</b>
	Museum	7,62	2,92	<b>0,38</b>	41,00	<b>14,03</b>
	Outer Ring R.	18,94	6,58	<b>0,35</b>	40,00	<b>6,08</b>
Enzym Tracer-F. (GOD)	Ondire upper	4,22	1,14	<b>0,27</b>	n.n.	n.n.
	Museum	7,62	3,13	<b>0,41</b>	n.n.	n.n.
	Outer Ring R.	18,94	7,26	<b>0,38</b>	n.n.	n.n.

(B)

Mit mAks DDT 1B2 im Coating Antigen-Format zeigt die Probe "Outer Ring Road" eine höhere Belastung (30,00 ng/g) mit DDT an. Etwas niedrigere Belastung zeigte die Probe "Ondire upper" (22,00 ng/g) und die geringste Belastung mit DDT lag in der Probe "Museum" (13,00 ng/g) vor. Im Enzym Tracer-Format mit DDT-Hapten-HRP wurden Konzentrationen zwischen 17 und 41 ng/g detektiert. In diesem Format zeigten sich mit mAk DDT 1B2 höhere Gehalte an DDT als im Coating Antigen-Format. Mit DDT-

Hapten-GOD wurde bei mAk DDT 1B2 keine nachweisbare Konzentration an DDT gefunden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der GC/MS-Untersuchungen lässt sich zusammenfassen, dass wiederum eine deutliche Überbestimmung vom DDT mit der ELISA-Methode zu beobachten ist.

Die **Tab. 25 (B)** vergleicht die Gehalte an DDT. Hier wurde eine Konzentrationserhöhung (Überbestimmung) von über 1.500% mehr im Coating Antigen-Format mit Ondire upper“ und von über 1.600% mehr im Enzym Tracer-Format mit Ondire upper“ festgestellt.

Die Messergebnisse mit mAks DDT im Coating Antigen- und Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD) stimmten untereinander größenordnungsmäßig gut überein; sie waren beim Assay mit mAk DDT 1B2 mit DDT-Hapten-HRP teilweise etwas höher bzw. konnten mit DDT-Hapten-GOD nicht nachgewiesen werden. Dies konnte durch Matrixeffekte und durch die Empfindlichkeit des mAks DDT 1B2 erklärt werden.

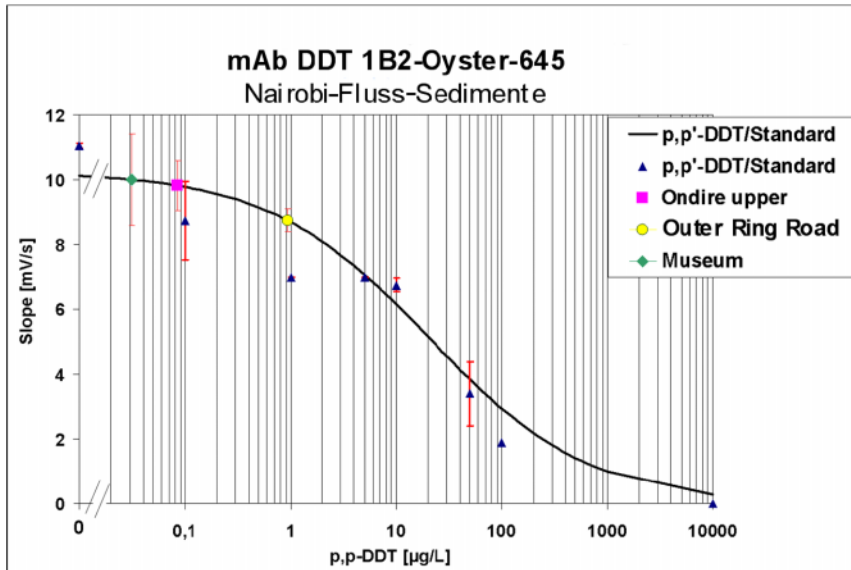
Das Sediment Outer Ring Road“ erwies sich mit ELISA als höher belastet, und eine insgesamt geringere Belastung lag im Sediment Museum“ vor. Mit den GC/MS-Messungen wurde der Gehalt an DDT im Sediment Outer Ring Road“ auch höher bestimmt, aber eine insgesamt geringere Belastung lag im Sediment Ondire upper“ vor, hier wurden die Matrixbelastungen unterschiedlich sichtbar.

Allgemein kann man feststellen, dass sich mit ELISA ebenso wie mit GC/MS eine Tendenz zu einer Belastung mit DDT der gemessenen Nairobi-Fluss-Sedimente zeigt.

Demnach ist es nicht verwunderlich, dass DDT und DDT-Metaboliten in den untersuchten Sedimenten eine höhere Konzentration zeigen, da die häufige Verwendung des DDT in Kenia über die Belastung der Gewässer in das Sediment adsorbiert und akkumuliert.

## 4.2 AQUA-OPTOSENSOR

Die Nairobi-Fluss-Sedimentproben ( **Ondire upper“**, **Museum“** und **Outer Ring Road“**) wurden im optischen Immunosensor AQUA-OPTOSENSOR in vierfacher Bestimmung mit **mAk DDT 1B2-Oyster®-645** vermessen. Parallel dazu wurde eine Standardkurve für *p,p'*-DDT (n = 1-3) als Referenzpunkt gemessen. Die ausgerechnete Sediment-Konzentration (n = 1-5) und die resultierenden Werte sind in **Abb. 32** (in MS-Excel unter 4-Parametergleichung:  $y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$  ausgewertet) zu sehen.



**Abb. 32: Analyse der Nairobi-Fluss-Sedimente mit AQUA-OPTOSENSOR (mAk DDT 1B2-Oyster<sup>®</sup>-645)**

**A** = 10,4; **B** = 0,5; **C** = 13,3 µg/L; *p,p'*-DDT; **D** = 0,0

( ) = Probe "Ondire upper" (3,01 ng/g *p,p'*-DDT)

(●) = Probe "Outer Ring Road" (35 ng/g *p,p'*-DDT)

(◇) = Probe "Museum" (0,73 ng/g *p,p'*-DDT)

Die auftretenden Werte mit mAk DDT 1B2-Oyster<sup>®</sup>-645 zeigen kleine Standardabweichungen, liegen aber auf der Standardkurve außerhalb des Messbereichs (für Sedimentproben). Dadurch ergab sich die Fragestellung, ob die Werte auch im Messbereich durch eine stärkere Verdünnung des Sediments nach dem Clean-up, eine größere Sediment-Menge vor den Probenvorbereitungen oder ein verbessertes Clean-up-Verfahren gemessen werden können. Eine Ausnahme war die Sedimentprobe "Outer Ring Road", wo eine Messung von 35 ng/g *p,p'*-DDT zu beobachten war.

Im Laufe dieser Versuche hat sich bestätigt, dass eine Tendenz der Ergebnisse für die Sedimentprobe "Outer Ring Road" mit dem AQUA-OPTOSENSOR, ELISA (30 ng/g *p,p'*-DDT) und GC/MS (18,94 ng/g *p,p'*-DDT) aufgetreten ist.

Insgesamt kann man sagen, dass der AQUA-OPTOSENSOR in der Zukunft auch für die Messungen von Sedimentproben und als Prescreeningsystem eingesetzt werden kann, um die Probenbearbeitungszeit zu verkürzen.

## IV ZUSAMMENFASSUNG

DDT ist eines der wichtigsten, je verwendeten Insektizide. Neben den Erfolgen von DDT, z.B. die globale Anwendung zur Malariabekämpfung oder als Pflanzenschutzmittel, ist die ökologische Problematik deutlich erkennbar geworden. DDT hat sich in der Nahrungskette angereichert; Vogel-, Fisch- und Amphibiensterben waren die Folge. 1972 erließen die USA und Kanada ein DDT-Verbot und Europa folgte nach. Es ist aber nur ein lokal begrenztes Verbot gewesen, da DDT in Entwicklungsländern nach wie vor zur Malariabekämpfung eingesetzt wird.

DDT hat eine lange Abbauzeit. Daher ist eine Überwachung der DDT-Rückstände notwendig. Billige, nachweisstarke und schnelle Verfahren werden hierfür benötigt. Immunochemische Methoden, wie sie in dieser Doktorarbeit entwickelt wurden, können diese Kriterien erfüllen. Sowohl Immunoassays als auch der hier erstmals zur Bestimmung von DDT eingesetzte optische Immunosensor (AQUA-OPTOSENSOR) stellen Techniken dar, mit deren Hilfe ein schneller Überblick über die Belastung von Proben erzielt werden kann.

Die vorliegende Dissertation setzt neu entwickelte monoklonale Antikörper zum Nachweis von DDT ein. Es war notwendig, neue Immunoreagenzien (Immunogene, Coating Antigene und Enzym Tracer) herzustellen, da einige Immunoreagenzien benötigt wurden, die nicht kommerziell verfügbar waren.

Hierzu wurden verschiedene Konjugate mit einem DDT-Hapten und unterschiedlichen Trägerproteinen (KLH, OVA und BSA) hergestellt. Die Ratten wurden damit immunisiert zur Bildung von Antikörpern, die das DDT selektiv erkannten.

Neben diesen Konjugaten wurden zusätzlich Konjugate von DDT-Hapten und Enzymen (HRP und GOD) für das Enzym Tracer-Format synthetisiert. Während die Hapten-Protein-Konjugate als Coating Antigene im indirekten ELISA (Coating Antigen-Format) eingesetzt wurden, dienten die Hapten-Enzyme-Konjugate als Tracer im direkten ELISA (Enzym Tracer-Format). Mit allen Konjugaten wurden die gewonnenen mAbs (DDT 1C1, DDT 7C12 und DDT 1B2) im ELISA-Format (Coating Antigen-Format und Enzym Tracer-Format) charakterisiert und mit Wasserproben (aus München und vom Nairobi-Fluss) und Nairobi-Fluss-Sedimentproben (Ondire upper“, Museum“ und Outer Ring Road“) getestet.

Für die Charakterisierung der Antikörper im Coating Antigen-Format wurden äußere Faktoren, wie z.B. der Einfluss der Lagertemperatur, überprüft. Ein weiterer Punkt war: Durch die Einführung eines zusätzlichen Absättigungsschrittes nach der Immobilisie



rung des Coating Antigens sollte überprüft werden, ob eventuell vorhandene unspezifische Bindungen für die mangelnde Konkurrenz verantwortlich waren und durch Absättigung verhindert werden konnten.

Für die Charakterisierung der Antikörper im Enzym Tracer-Format wurden mehrere Vorbeschichtungen der Mikrotiterplatte in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Absättigungsreagenzien und der Einfluss verschiedener Substrat-Konzentrationen auf die Assays wurden getestet. Abschließende Untersuchungen zur Ermittlung der Kreuzreaktivitäten in beiden ELISA-Formaten sollten die Selektivität und Sensitivität des anti-DDT mAbs zeigen.

Im Coating Antigen-Format zeigt der mAb DDT 7C12 ein IC 50% für *p,p'*-DDT von  $1,8 \pm 0,7 \mu\text{g/L}$ , mit mAb DDT 1B2 von  $7,5 \pm 2,2 \mu\text{g/L}$ , und mit mAb DDT 1C1 der IC 50% für *o,p'*-DDT war  $4,2 \pm 0,5 \mu\text{g/L}$ .

Im Enzym Tracer-Format mit DDT-Hapten-HRP zeigte mAb DDT 1C1 eine Selektivität und Sensitivität für *o,p'*-Isomere mit Testmittelpunkt (IC 50%) für *o,p'*-DDT von  $1,0 \pm 0,3 \mu\text{g/L}$ , der mAb DDT 7C12 zeigte mehr Selektivität und Sensitivität für *p,p'*-Isomere mit einem IC 50% für *p,p'*-DDT von  $0,5 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$  und der mAb DDT 1B2 zeigte sich als sehr selektiv für *p,p'*-DDT, hatte aber einen höheren Testmittelpunkt mit einem IC 50% von  $4,2 \pm 1,6 \mu\text{g/L}$ .

Die Kreuzreaktivitäten waren unabhängig vom Assay-Format und den Enzymen, die im Enzym Tracer-Format verwendet wurden. Allgemein war der Assay im Coating Antigen-Format weniger sensitiv als im Enzym Tracer-Format.

Die neu entwickelten, optimierten und charakterisierten Immunoreagenzien wurden in unterschiedlichen Immunoassays im Enzym Tracer-Format-ELISA (Weber et al., 2004) und Immunosensoren z.B. im trennungsfreien elektrochemischen Immunosensor (Robinson et al., 2004; Keay & McNeil, 1998) und im AQUA-OPTOSENSOR bereits angewendet.

Das AQUA-OPTOSENSOR-System besteht aus einem Grundgerät und Einweg-Chip und wurde zur quantitativ-diskontinuierlichen Messung von Einzelproben automatisiert. Für die Anwendungen im optischen Immunosensor AQUA-OPTOSENSOR wurde die spezifisch immunochemische Analyterkennung durch Fluoreszenzfarbstoff (Oyster<sup>®</sup>-645) markierte anti-DDT mAbs erreicht. Die Anregung der markierten mAbs wurde über das evaneszente Feld realisiert.

Die mAbs DDT-Oyster<sup>®</sup>-645 wurden mit AQUA-OPTOSENSOR charakterisiert. Sie zeigen IC 50% Werte unter  $10 \mu\text{g/L}$  für *p,p'*-DDT oder *o,p'*-DDT (IC 50% für *p,p'*-

DDT mit mAk DDT 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645 lag bei 3,4 µg/L ; IC 50% für *p,p'*-DDT mit mAk DDT 1B2-Oyster<sup>®</sup>-645 betrug 8,6 µg/L; IC 50% für *o,p'*-DDT mit mAk DDT 1C1-Oyster<sup>®</sup>-645 war 3,5 µg/L).

Die Wasserproben aus München, dem Nairobi-Fluss und drei Nairobi-Fluss-Sedimente wurden im ELISA (Coating Antigen-Format und Enzym Tracer-Format) mit mAks DDT 1C1, DDT 7C12 und DDT 1B2 getestet.

Bei der Messung von Wasserproben aus München mit ELISA und AQUA-OPTOSENSOR-System zeigen die % Control-Werte beider Formate vergleichbare Ergebnisse.

Die Ergebnisse mit Wasserproben aus dem Nairobi-Fluss in ELISA-Formaten zeigen eine Tendenz zur Überbestimmung. Der mAk DDT 1B2 bestimmt in beiden ELISA-Formaten höher als der mAk DDT 7C12. Dies ist insofern bemerkenswert als der mAk DDT 7C12 insgesamt höhere Kreuzreaktivitäten gegenüber den getesteten DDT-Isomeren und -Metaboliten zeigt als der mAk DDT 1B2. Da die Überbestimmung aber in allen Fällen zu beobachten war, ist ein größerer Einfluss der Probenmatrix auf den mAk DDT 1B2 wahrscheinlich.

Die Ergebnisse mit Wasserproben und Sedimentproben wurden mit ELISA und dem AQUA-OPTOSENSOR verglichen. Zusätzlich wurden die Sedimentproben mit GC/MS charakterisiert und dementsprechend mit ELISA und AQUA-OPTOSENSOR verglichen.

Das Sediment "Outer Ring Road" erwies sich mit ELISA (Coating Antigen-Format), GC/MS-Messungen und AQUA-OPTOSENSOR als höher belastet und eine insgesamt geringere Belastung mit dem ELISA lag im Sediment "Museum" vor. In Bestimmung mit den GC/MS-Messungen ist eine insgesamt geringere Belastung im Sediment "Ondire upper" aufgetreten. Für die "Ondire upper"- und "Museum"-Sedimente lagen die Ergebnisse außerhalb des Messbereiches.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass in dieser Studie die grundsätzliche Eignung des AQUA-OPTOSENSORS für Nachweisverfahren von DDT und für eine kostengünstige Überwachung von Oberflächengewässern belegt wurde.

## V AUSBLICK

In dieser Arbeit wurden Immunoreagenzien für DDT in einem konventionellen ELISA charakterisiert und auf einen automatisierten optischen Immunosensor (AQUA-OPTOSENSOR) übertragen. Durch die Versuche mit verschiedenen Standardsubstanzen konnte gezeigt werden, dass die anti-DDT mAbs selektiv (mAb DDT 1B2 für *p,p'*-DDT-Isomere) und sensitiv (mAb DDT 1C1 für *o,p'*-Isomere und mAb DDT 7C12 für *p,p'*-DDT-Isomere) die DDT-Isomere und DDT-Metaboliten erkannten.

In dieser Arbeit wurde zunächst mit einem Chip nur ein Analyt gemessen. Prinzipiell ist aber mit diesem Immunosensor die Bestimmung von mehreren Analyten auf einem Chip möglich. Erste Ergebnisse konnten bereits für drei Analyte in einer anderen Arbeit gezeigt werden. Mit diesem Multi-Analyt-Konzept ist eine kostengünstige, schnelle und umweltschonende Umweltanalytik möglich, die auch vor Ort durchgeführt werden kann. Wasserproben können direkt analysiert werden, für Sedimentproben sollte in Zukunft noch eine vereinfachte, und damit schnell durchzuführende Probenvorbereitung ausgearbeitet werden.

Die kurze Messzeit von ca. 2 min pro Einzelmessung bestätigt den AQUA-OPTOSENSOR als günstiges und schnelles System und leistet damit einen sehr wichtigen Beitrag als Screening-Methode in der Umweltanalytik.

**VI LITERATURVERZEICHNIS**

- Abad, A., Manclus, J.J., Mojarrad, F., Mercader, J.V., Miranda, M.A, Primo, J., Guardiola, V., Montoya, A., 1997. Hapten synthesis and production of monoclonal antibodies to DDT and related compounds. *J. Agric. Food Chem.* 45 (9), 3694-3702.
- Alvarez, M., Calle, A., Tamayo, J., Lechuga, L., M., Abad, A., Montoya, A., 2003. Development of nanomechanical biosensor for detection of the pesticide DDT. *Biosens. Bioelectron.* 18, 649-653.
- Anfossi, L., Giraudi, G., Tozzi, C., Giovandoli, C., Baggiani, C., Vanni, A., 2004. Development of a non-competitive immunoassay for monitoring DDT, its metabolites and analogues in water samples. *Anal. Chim. Acta* 506, 87-95.
- ATSDR (Agency for toxic substances and disease registry), September 2002, US Department of Health and Human Services, Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD, Atlanta, GA. USA.
- Attaran, A., Roberts, D.R., Curtis, C.F., Kilama, W.L., 2000. Balancing on the backs of the poor. *Nature Medicine* 6 (7), 729-731.
- Banerjee, B.D., 1987. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of DDA [2,2-bis-(4-chlorophenyl)acetic acid] in urine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 798-804.
- Banerjee, B.D., Pasha, S.T., Koner, B.C., 1996. Hapten synthesis and production of rabbit antibodies with reactivity to DDT and its metabolites for the development of an immunoassay. *Med. Sci. Res.* 24, (India) 553.
- Barcelo, D., 1991. Occurrence handling and chromatographic determination of pesticides in the aquatic environment. *Analyst* 116, 681.
- Baron, D., 1995. Entwicklung und Produktion monoklonaler Antikörper. *Bioforum* 18, 145-155.
- Beard, J., and Australian Rural Health Research Collaboration, 2006. DDT and human health. *Science of the Total Environment* 355 (1-3), 78-89.
- Beasley, H.L., Phongkham, T., Daunt, M.H., Guihot, S.L., Skerritt, J.H., 1998. Development of a panel of immunoassays for monitoring DDT, its metabolites and analogues in food and environmental matrixes. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3339-3352.
- Bier, F.F., Stöcklein, W., Böchner, M., Bilitewski, U., Schmid, R.D., 1992. Use of a fibre optic immunosensor for the detection of pesticides. *Sens. Actuators B: Chemical* 7 (1-3), 509-512.

- Bossi, A., Piletsky, S.A., Righetti, P.G., Turner, A.P.F., 2000. Capillary electrophoresis coupled to biosensor detection. *Journal of Chromatography A.*, 892, 143-153.
- Botchkareva, A.E., Fini, F., Eremin, S.A., Mercader, J.V., Montoya, A., Girotti, S., 2002. Development of a heterogeneous chemiluminescent flow immunoassay for DDT and related compounds. *Anal. Chim. Acta* 453, 43-52.
- Botchkareva, A.E., Eremin, S.A., Montoya, A., Manclus, J.J., Mickova, B., Rauch, P., Fini, F., Girotti, S., 2003. Development of chemiluminescent ELISAs to DDT and its metabolites in food and environmental samples. *J. Immunological Methods* 283 (1-2), 45-57.
- Bouwman, H., Sereda, B., Meinhardt, H.M., 2006. Simultaneous presence of DDT and pyrethroid residues in human breast milk from a malaria endemic area in South Africa. *Environmental Pollution*, in press, corrected proof.
- Brecht, A., Gauglitz, G., 1997. Label free optical immunoprobes for pesticide detection. *Analytica Chimica Acta* 347, 219-233.
- Breitling, F., Dübel, S., 1997. *Rekombinante Antikörper*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Burgisser, D., Frey, S., Gutte, B., Klauser, S., 1990. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against the insecticide DDT. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166 (3), 1228-1236.
- Burke, E.R., Holden, A.J., Shaw, I.C., 2003. A method to determine residue levels of persistent organochlorine pesticides in human milk from Indonesian women. *Chemosphere* 50, 529-535.
- Buser, H.-R., Müller, M.D., 1995. Isomer-selective and enantiomerselective determination of DDT and related compounds using chiral high-resolution gas chromatography/mass spectrometry and chiral high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 67, 2691-2698.
- Centeno, E.R., Johnson, W.J., Sehon A.H., 1970. Antibodies to Two Common Pesticides, DDT and Malathion. *Int. Arch. Allergy* 37, 1-13.
- Columé, A., Cárdenas, S., Gallego, M., Valcárcel, M., 2001. Evaluation of an automated solid-phase extraction system for the enrichment of organochlorine pesticides from waters. *Talanta*, 54, (5), 943-951.
- Connolly, A.L., Mahy, H.M., 2002. A Comparison of Blocking Solutions Used in Western Blotting. KPL Research and Development. KPL APPLICATION NOTE: March 2002.

- Dankwardt, A., 2000. Immunochemical analysis in pesticide analysis. In: Meyers, R.A. (Ed.), Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. ISBN 0471976709.
- Dirtu, A.C., Cernat, R., Dragan, D., Mocanu, R., Grieken, R.V., Neels, H., Covaci, A., 2006. Organohalogenated pollutants in human serum Iassy, Romania and their relation with age and gender. Environment International.
- EC Water Framework Directive (WFD) Council Directive relating to the quality of water intended for human consumption (80/778/EC), Off. J. Eur. Commun., L229/11-49.
- EC Water Framework Directive (WFD) of the European Parliament and the council of 3 November 1998 relating of the quality of water intended for the human consumption. (98/83/EC), Off. J. Eur. Commun., L330, 32-54.
- EC Water Framework Directive (WFD) of the European Parliament and the council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. (2000/60/EC), Off. J. Eur. Commun., L327, 1-72.
- Emon van, J.M., Lopez-Avila, V., 1992. Immunochemical methods for environmental analysis. Anal. Chem. 64 (2), 79A-88A.
- Emon van, J.M., Gerlach, C.L., 1995. The right environment for the immunoassay. Chemtech. 11, 51-54.
- Emon van, J.M., Gerlach, C.L., 1998. Expanding the role of environmental immunoassays: Technical capabilities, regulatory issues, and communication vehicles, Anal.Chim. Acta 376, 55-59.
- Emon van, J.M., 2001. Immunochemical applications in environmental science. J. AOAC Int. 84, 125-133.
- EPA (US Environmental Protection Agency), 1972. press release: DDT ban takes effect, Dec 31.
- EPA (US Environmental Protection Agency), 1996. Soil Screening for DDT by immunoassay (Method 4042); Method 8081/8270.
- Erlanger, B.F., 1980. The Preparation of Antigenic Hapten-Carrier Conjugates: A Survey. Methods in Enzymology, 70, 85-104.
- Fatima, R.A., Ahmad, M., 2006. *Allium cepa* derived EROD as a potential biomarker for the presence of certain pesticides in water. Chemosphere 62, 527-537.
- Franek, M., Hruska, K., 2005. Antibody methods for environmental and food analysis: a review. Vet. Med. – Czech. 50 (1), 1-10.

- Friemel, H., 1980. Immunologische Arbeitsmethode, 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Galfre, G., Milstein, C., 1981. Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures, *Methods Enzymol.*, 73, 3-46.
- Gamberg, M., Braune, B., Davey, E., Elkin, B., Hoekstra, P.F., Kennedy, D., Macdonald, C., Muir, D., Nirwal, A., Wayland, M., Zeeb, B., 2005. Spatial and temporal trends of contaminants in terrestrial biota from the Canadian Arctic. Review article. *Science of the Total Environment* 351-352, 148-164.
- Gauglitz, G., 2005. Direct optical sensors: principles and selected applications. *Anal Bioanal Chem.* 381 (1), 141-155.
- Gesetz über den Verkehr mit DDT (DDT-Gesetz) vom 7. August 1972 (BGBl. I S. 1385) zuletzt geändert durch Art. 8 § 2 Gesundheitseinrichtungen - Neuordnungsg. v. 24. 6 1994 (BGBl. 1 S. 1416).
- Giraudi, G., Baggiani, C., Cosmaro, A., Santia, E., Vanni, A., 1998. A highly specific polyclonal antiserum to the environmental contaminant 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(4-chlorophenyl)-ethane (*p,p'*-DDT). *Fresenius J. Anal. Chem.* 360, 235-240.
- Gonzalez-Martinez, M.A., Puchades, R., Maquieira, A., Ferrer, I., Marco, M.P., Barcelo, D., 1999. Reversible Immunosensor for the automatic determination of atrazine. Selection and performance of three polyclonal antisera. *Anal. Chim. Acta.* 386 (3), 201-210.
- Graham, L., Campbell, M., 2001. Screening of Environmental Samples for an Estrogenic Pollutant: DDT. Cooperative Research Programs, 107 Foster Hall, Lincoln University.
- Greenlee, A.R., Ellis, T.M., Berg, R.L., Mercieca, M.D., 2005. Pregnancy outcomes for mouse preimplantation embryos exposed in vitro to the estrogenic pesticide *o,p* - DDT. *Reproductive Toxicology* 20 (2), 229-238.
- Guardino, X., Serra, C., Obiols, J., Rosell, M.G., Berenguer, M.J., Lopez, F., Brosa, J., 1996. Determination of DDT and related compounds in blood samples from agricultural workers. *J Chromatogr A.* 719 (1), 141-7.
- Hale, Z.M., Payne, F.P., Marks, R.S., Lowe, C.R., Levine, M.M., 1996. The single mode tapered optical fibre loop immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 11 (1-2), 137-148.

- Hammock, B.D., Mumma, R.O., 1980. Potential of Immunochemical Technology for Pesticide Residue Analysis, *Pesticide Analytical Methodology*. ACS Symposium 136, American Chemical Society: Washington, DC, 321-352.
- Hammock, B.D., Gee, S.J., Cheung, P.Y.K., Miyamoto, T., Goodrow, M.H., Van Emon, P., Seiber, J.N., 1987. Utility of immunoassay in pesticide trace analysis. In: Greenhalgh, R., Roberts T.R (Eds.), *Pesticide Science and Biotechnology*, Blackwell Scientific Publications, 309-316.
- Hammock, B.D., Harrison, R.O., Goodrow, M.H., 1990. Hapten synthesis, antibody development, and competitive inhibition enzyme immunoassay for s-triazine herbicides. *J. Agric. Food Chem.* 38, 990-996.
- Hardell, L., van Bavel, B., Lindström, G., Björnfoth, H., Orgum, P., Carlberg, M., Sörensen, S., Graflund, M., 2004. Adipose tissue concentrations of *p,p*-DDE and the risk for endometrial cancer. *Gynecologic Oncology* 95 (3), 706-711.
- Hochel, I., Musil, M., 2002. Development of an Indirect Competitive ELISA of DDT. *Food and Agricultural Immunologie* 14 (4), 285-300.
- Hock, B., 1993. Immunochemische Verfahren in der Umweltanalytik und ihre Perspektiven. *Umweltwissenschaften und Schadstoffforschung – Zeitschrift für Umweltchemie Ökotoxikologie* 5, 309-319.
- Hong, J.Y., Kim, J.-H., Park, S.-J., Lho, D.-S., Choi, M.J., 2003. Production and Characterisation of DDT Antibodies and its Application to Enzyme Immunoassay: Relation of Response and Affinity to Coating Ligand. *Bull. Korean Chem. Soc.* 24 (11), 1605-1608.
- Hong, Z., Yonglong, L., Dawson, R.W., Yajuan, S., Tieyu, W., 2005. Classification and ordination of DDT and HCH in soil samples from the Guanting Reservoir, China, *Chemosphere* 60, 762-769.
- Howard, R.R., 1996. Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. *Sci. Total Environ.* 185, 3-26.
- Jaraczewska, K., Lulek, J., Covaci, A., Voorspoels, S., Kaluba-Skotarcak, A., Drews, K., Schepens, P., 2006. Distribution of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers in human umbilical cord serum, maternal serum and milk from Wielkopolska region, Poland. *Science of the Total Environment*.
- Keay, R.W., McNeil, C.J., 1998. Separation-free electrochemical immunosensor for rapid determination of atrazine. *Biosens. Bioelectron.* 13, 963-970.



- Kennisch, M.J., Ruppel, B.E., 1996. PCB contamination in selected estuarine and coastal marine finfish and shellfish of New Jersey. *Estuaries*, 19, 288-295.
- Kennedy, R.C., Melnick, J.L., Dreesman, G.R., 1986. Anti-Antikörper, Spektrum der Wissenschaft 9, 66-75.
- Kishimba, M.A., Mwevura, H.H., Mmochi, A.J., Mihale, M., Hellar, H., 2004, The status of pesticide pollution in Tanzania. *Talanta* 64, 48-53.
- Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Krämer, P.M., 1996. Biosensor for monitoring pesticide residues in the environment: past, present, and future. *J. AOAC Int.* 79, 1245-1254.
- Krämer, P.M., 2002. Immunochemische Methoden in der Umweltanalytik, In: Wasser, K. Höll, A. Grohmann (Hrsg.), Walter de Gruyter, Berlin. Kapitel 4.8, 210-222, 8.
- Krämer, P., 2003. Biosensoren In: Initiativen zum Umweltschutz, Brand 54 (DBU): Vor-Ort-Analytik für die Erkundung von kontaminierten Standorten. B. Barczewski, K. Batereanu, J. Flachowsky, V. Franzius, M. Hempel (Hrsg.), Erich Schmid Verlag Berlin, Kapitel 3.5, 83-99.
- Krämer, P.M., Goodrow, M.H., Kremmer, E., 2004. Enzyme-linked immunosorbent assays based on rabbit polyclonal and rat monoclonal antibodies against isoproturon. *J. Agric. Food Chem.* 52 (9), 2462-2471.
- Krämer, P.M., Kremmer, E., Weber, C.M., Ciomasu, I.M., Forster, S., Kettrup, A.A., 2005. Development of a panel of new rat monoclonal antibodies with different selectivities and sensitivities for 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and other nitroaromatic compounds. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 1919-1933.
- Krämer, P.M., Franke, A., Zherdev, A.V., Yazynina, E.V., Dzantiev, B.B., 2005. Comparison of two express immunotechniques with polyelectrolyte carries, ELISA and FIHAA, for the analysis of atrazine. *Talanta* 65, 324-330.
- Kremmer, E., Kranz, B.R., Hille, A., Klein, K., Eulitz, M., Hoffmann-Fezer, G., Feiden, W., Herrmann, K., Delecluse, H.-J., Delson, G., Bornkamm, G.W., Mueller-Lantzsch, N., Grässer, F.A., 1995. Rat monoclonal antibodies differentiating between the Epstein-Barr virus nuclear antigens 2A (EBNA2A) and 2B (EBNA2B), Short communication, *Virology* 208, 336-342.
- Kuhlmann, W.D., Peschke, P., 1986. Glucose oxidase as label in histological immunoassays with enzyme-amplification in a two-step technique: coimmobilized horse-

- radisch peroxidase as secondary system enzyme fort he chromogen oxidation. *Histochemistry*, 85, 13-17.
- Kulke, U., 2005. Verhängnisvolles Verbot. *Die Welt*.
- Kumar, A., Dayal, P., Shukla, G., Singh, G., Joseph, P.E., 2006. DDT and HCH residue load in mother's breast milk: A survey of lactating mother's from remote villages in Agra region. *Environment International* 32 (2), 248-251.
- Küster, H., 2005. *Das ist Ökologie. Die biologischen Grundlagen unserer Existenz*. Verlag C.H. Beck oHG, München, 34.
- Langone, J.J., Van Vunakis, H., 1975. Radioimmunoassay for dieldrin and aldrin. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 10, 163-171.
- Li, J., Zhu, T., Wang, F., Qiu, X.H., Lin, W.L., 2006. Observation of organochlorine pesticides in the air of the Mt. Everest region. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63 (1), 33-41.
- Luppa, P.B., 2001. *Der Weg vom heterogenen Immunoassay zum Immunosensor: Prinzipien und Applikationen im Bereich der Klinischen Chemie*. 2. Biosensor Symposium, Tübingen.
- Luzardo, O.P., Goethals, M., Zumbado, M., Álvarez-León, E.E., Cabrera, F., Serra-Majem L., Boada, L.D., 2006. Increasing serum levels of non-DDT-derivative organochlorine pesticides in the younger population of the Canary Islands (Spain), *Science of The Total Environment*, in press, corrected proof.
- Mak, L.H., Knoll, M., Dankbar, N., Sundermeier, C., Gorschlüter, A., 2006. Electro-magnetic biosensor for binding force measurements on ligand-receptor complexes. *Sensors and Actuators B: Chemical* 114 (1), 132-140.
- Mallat, E., Barcelo, D., Barzen, C., Gauglitz, G., Abuknesha, R., 2001. Immunosensors for pesticide determination in natural waters. *Trends Anal. Chem.* 20 (3), 124-132.
- Marco, J.A.M., Kishimba, M.A., 2005. Concentrations of pesticide residues in grasses and sedges due to point source contamination and the indications for public health risks, Vikuge, Tanzania. *Chemosphere* 61 (9), 1293-1298.
- Martens, D., Schramm, K.-W., Kettrup, A., 2000. In: Gawlik, B.M., Platzer, B., Muntau H., (Eds.), *Monitoring of chlorinated and other organic trace contaminants in selected stretches of the Liao and Yangtse River (China)*, European Commission, EUR 19531 EN, ECSC-EC-EAEC, Brussels, Luxembourg, p. 95.
- Marty, J.-L., Gracia, D., Rouillon, R., 1995. Biosensor: potential in pesticide detection, *Trends Anal. Chem.* 14, 329-333.

- Marty, J.-L., Leca, B., Noguer, T., 1998. Biosensors for the detection of pesticides. *Analisis Magazine* 26 (6), 144-149.
- Mauriz, E., Calle, A., Montoya, A., Lechuga, L.M., 2006 a). Determination of environmental organic pollutants with a portable optical immunosensor. *Talanta*, 69, (2), 359-364.
- Mauriz, E., Calle, A., Manclus, J.J., Montoya, A., Hildebrandt, A., Barcelo, D., Lechuga, L.M., 2006 b). Optical immunosensor for fast and sensitive detection of DDT and related compounds in river waters samples. *Biosensor and Bioelectronics*. Available online 25 July 2006.
- Metcalf, R.L., 1995. Insect Control Technology, In: Kroschwitz, J., Howe-Grant, M. (Eds.), *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. Vol. 14, New York, NY, John Wiley and Sons, Inc., 524-602.
- Meulenberg, E.P., Mulder, W.H., Stoks, P.G., 1995. Immunoassays for pesticides, *Environ. Sci. Technol.* 29, 553-561.
- Meusel, M., Trau, D., Katerkamp, A., Meier, F., Polzius, R., Cammann, K., 1998. New ways in bioanalysis – one-way optical sensor Sensor-Chip for environmental analysis, *Sensors and Actuators B* 51, 249-255.
- Müller, P.H., 1948. Dichloro-diphenyl-trichloroethane and newer pesticides. Nobel Lecture, December 11, 1948.
- Nelson, J.O., Karu, A.E., Wong R.B., 1995. Immunoanalysis of Agrochemicals. *Emerging Technologies*, ACS Symp. Series, ACS, Washington DC 586.
- Oka, M., Arai, T., Shibata, Y., Miyazaki, N., 2006. Reproductive transfer of organochlorines in viviparous surfperch, *Ditrema temminicki*. *Environmental Pollution* 142, 383-387.
- Ostrea, E.M., Jr., Villanueva-Uy, E., Bielawski, D.M., Posecion, N.C., Jr., Corrion, M.L., Jin, Y., Janisse, J.J., Ager, J.W., 2006. Maternal hair - An appropriate matrix for detecting maternal exposure to pesticides during pregnancy. *Environmental Research*, 101, 312-322.
- Phillips, T.M., 1989. High-performance immunoaffinity chromatography. *Adv. Chromatogr.*, 29, 133-173.
- Pollmer, U., 2000. Auf Leben und Tod: Der Kampf ums DDT. *EU.L.E.N-SPIEGEL*, 8.
- Räuber, C., Krämer, P.M., 2006. Multianalyte detection of pesticides using an optical immunosensor. Poster at the Ninth World Congress on Biosensors, Toronto, Canada, 10-12 May, 2006.

- Rauch, P., Zellmer, A., CANDOR Bioscience GmbH, Münster; Dankbar, N., Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Universität Münster; Specht, C., PARA Bioscience GmbH, Gronau; Sperling, D., MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, 2005. Störeffekte bei Immunoassays erkennen und vermeiden, Das – Themenheft, BIOCOM AG. 4, 6.
- Rauch, P., 2005. Hintergrund bei Immunoassays. GIT Verlag GmbH Co. KG, Darmstadt, BIOforum 11, 22-24.
- Rinaldi, A., 2004. Fighting malaria at the crossroads. EMBO reports 5, 847-851.
- Roberts, D.R., Manguin, S., Mouchet, J., 2000. DDT house spraying and re-emerging malaria. The Lancet 356, 330-332.
- Robinson, M.J., McNeil, C.J., Weber, C.M., Krämer, P.M., Stanker, L., 2004. Application of electrochemical immunosensor technology to pollution monitoring in the Nairobi river, Poster at the Eighth World Congress on Biosensors, Granada, Spain, 24-25 May, 2004 (Abstract book P2.4.12).
- Rodil, R., Popp, P., 2006. Development of pressurized subcritical water extraction combined with stir bar sorptive extraction for the analysis of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in soils. Journal of Chromatography, A, 1124, (1), 82-90.
- Roger, K.R., Mascini, M., 1998. Biosensor for Field Analytical Monitoring. Field Analytical Chemistry and Technology 2, 317-331.
- Rogers, K.R., 2000. Principles of affinity-based biosensors, Molecular Biotechnology 14, 109-129.
- Rogers, K., 1995. Biosensors for environmental applications. Biosens. Bioelectron. 10, 533-541.
- Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.K., 1995. Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Römpp Chemie Lexikon, 1996. H. Römpp, J. Falbe, M. Regitz (Hrsg.). Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Saeed, T., Sawaya, W.N., Ahmed, N., Rajagopal, S., Al-Omair, A., Al-Awadhi, F., 2001. Chlorinated pesticide residues in the total diet of Kuwait. Food Control 12, 91-98.
- Sapozhnikova, Y., Zubcov, N., Hungerford, S., Roy, A.L., Boicenco, N., Zubcov, E., Schlenk, D., 2005. Evaluation of pesticides and metals in fish of the Dniester River, Moldova. Chemosphere 60 (2), 196-205.

- Schäfer, W.R., Zharadnik, H.P., Frijus-Plessen, N., Schneider, K., 1995. Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung. Auswahl von expositionsrelevanten Xenoestrogenen, Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung, Forschungsbericht.
- Scheyer, A., Graeff, C., Morville, S., Mirabel, P., Millet, M., 2005. Analysis of some organochlorine pesticides in an urban atmosphere (Strasbourg, east of France). *Chemosphere* 58, 1517-1524.
- Schneider, P., Goodrow, M.H., Gee, S.J., Hammock, B.D., 1994. A highly sensitive and rapid ELISA for the arylurea herbicides diuron, monuron, and linuron. *J. Agric. Food Chem.* 42, 301-309.
- Schult, K., Katerkamp, A., Trau, D., Grawe, F., Cammann, K., Meusel, M., 1999. Disposable optical sensor chip for medical diagnostics: new ways in bioanalysis, *Anal. Chem.* 71, 5430-5435.
- Schütz, A.J., Winklmeier, M., Weller, M.G., Niessner, R., 1997. Stabilization of horseradish peroxidase (HRP) for the use in immunochemical sensors. *SPIE Proc.*, 3105, 332-340.
- Selby, C., 1999. Interference in immunoassays (Review article). *Ann. Clin. Biochem.*, 36, 704-721.
- Shriver-Lake, L.C., Golden, J.P., Patonay, G., Narayanan, N., Ligler, F.S., 1995. Use of three longer-wavelength fluorophores with the fiber-optic biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 29 (1-3), 25-30.
- Skark, C., Zullei-Seibert, N., Schöttler, U., Schlett, C., 1998. The occurrence of glyphosat in surface water. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 70, 93-104.
- Stroh, K., 2005, Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, Umweltchemikalien mit hormoneller Wirkung.
- Stryer, Biochemie, Übersetzung der 4. amerikan. Aufl. (1995), Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 1996.
- Sudaryanto, A., Kunisue, T., Kajiwara, N., Iwata, H., Adibroto, T.A., Hartono P., Tanabe, S., 2006. Specific accumulation of organochlorines in human breast milk from Indonesia: Levels, distribution, accumulation kinetics and infant health risk, *Environmental Pollution* 139 (1), 107-117.
- The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Stockholm, Sweden, May 2004.

- Thomas, G.O., Wilkinson, M., Hodson, S., Jones, K.C., 2006. Organohalogen chemicals in human blood from the United Kingdom, *Environmental Pollution* 141 (1), 30-41.
- Thurman, E.M., Cromwell, A.E., 2000. Atmospheric Transport, Deposition, and Fate of Triazine Herbicides and Their Metabolites in Pristine Areas at Isle Royale National Park. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3079-3085.
- Tijssen, P., 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. Series Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology; v15, Elsevier Science Publishers B,V., Amsterdam, The Netherlands.
- Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson, G.S., 1987. Biosensor: Fundamentals and Applications, Oxford University Press.
- Valentini, F., Compagnone, D., Giraudi, G., Palleschi, G., 2003. Electrochemical ELISA of DDT related compounds: an waste waters, *Analytica Chimica Acta* 487 (1), 83-90.
- Villa, S., Negrelli, C., Maggi, V., Finizio, A., Vighi, M., 2005. Analysis of a firm core for assessing POP seasonal accumulation on an Alpine glacier. *Ecotoxicol. Environ, Saf. online: doi:10.1016/j.ecoenv.2005.05.006.*
- Villa, S., Negrelli, C., Finizio, A., Flora, O., Vighi, M., 2006 a). Organochlorine compounds in ice melt water from Italian Alpine rivers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63 (1), 84-90.
- Villa, S., Negrelli, C., Maggi, V., Finizio A., Vighi, M., 2006 b). Analysis of a firm core for assessing POP seasonal accumulation on an Alpine glacier. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63 (1), 17-24.
- Walter, J.R., Chen. A., 2005. Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *The Lancet* 366 (9487) 763-773.
- Weber, C.M., Krämer, P.M., Kremmer, E., Kettrup, A.A., 2004. Development of rat monoclonal antibody-based ELISAs for DDT. Poster at the 2<sup>nd</sup> Asian International Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety. Songkla, Thailand, 26-29 September 2004, (Abstract book, P-9, p. 51, ISBN 974-537-518-7).
- Weber, C.M., Forster, S., Kremmer, E., Rauch, P., Mulaa, F.J., Stanker, L.H., Krämer, P.M., 2005. A New Optical Immunosensor Platform for the Analysis of Pyrethroids and DDT in Water. Abstract Pacificchem, Honolulu, Hawaii, Dec 15-20.
- Wendo, C., 2004. Uganda considers DDT to protect homes from malaria. *The Lancet* 363, 1376.

- World Health Organisation (WHO), 1989. Environmental Health Criteria 83, DDT and its Derivatives Environmental Effects, Geneva, Switzerland.
- Yalow, R.S., Betson, S.A., 1959. Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. Nature, 184, 1648-1649.
- Zhou, Y.-Y., Wang, S.-W., Kim, K.-N., Li, J.-H., Yan, X.-P., 2006. Evaluation of expanded graphite as on-line solid-phase extraction sorbent for high performance liquid chromatographic determination of trace levels of DDTs in water samples. Talanta 69, 970-975.

### **Homepages**

<http://www.chemievorlesung.unikiel.de/1992-umweltbelastung/pesti2.htm>

<http://www.members.aol.com/reisemed/krank/malaria.htm>

<http://www.132.187.168.3/lehre/V-Pestizide.pdf>

<http://www.stmugv.bayern.de/de/lebensmittel/index.htm>

[http://www.pops.int/documents/convtext/convtext\\_en.pdf](http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_en.pdf)

<http://www.buetzer.info/fileadmin/pb/pdf-Dateien/DDT.pdf>

<http://www.coring.de>

<http://www.hal-alergie.de>

[http://www.unep.org/roa/Nairobi\\_River/Webpages](http://www.unep.org/roa/Nairobi_River/Webpages)

## VII ANHANG

### Teil A: Auflistung der allgemeinen Chemikalien und Lösungen

#### 1 Immunoassay

Während der Experimente wurden Chemikalien und Lösungen verwendet, die im folgenden aufgelistet sind:

#### *Allgemeine Chemikalien*

- *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDD, Institut für Organische Industrielle Chemie (Warsaw, Poland), *p,p'*-DDA, (Pestanal<sup>®</sup>), Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
- Bovine Serum Albumin (BSA), Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), Ovalbumin (OVA), Milchpulver (entfettet, trocken), Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%; MW 34,02 g/Mol), 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 9%), N-Hydroxysuccinimid (NHS, 97%), Dimethylformamid (DMF, 99%; C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO; MW 73,10 g/Mol), und Dimethylsulfoxid (DMSO, 99%; C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS; MW 78,13 g/Mol), Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (TRIS), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
- DDT-Hapten (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>4</sub>O<sub>2</sub>; MW 406,14 g/Mol), Solvias AG, Basel, Schweiz,
- Meerrettichperoxidase (POD oder HRP) (ca. 1500 U/mg), Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Glucose Oxidase, (GOD, ca. 1 million U/mg), Biozyme Laboratories, South Wales, England
- Micro-O-protect, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- Glycerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>; MW 92,09 g/Mol), Pierce, Rockford, IL, USA
- Methanol (CH<sub>3</sub>OH; MW 32,04 g/Mol), Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH; MW 46,1 g/Mol), Isopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O; MW 60,10 g/mol), n-Hexan (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>; MW 86,18 g/Mol), Aceton (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O; MW 58,08 g/Mol), Dichloromethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; MW 84,93 g/Mol), Acetonitril (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N; MW 41,05 g/Mol), Zitronensäure-Monohydrat (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>; MW 192,1 g/Mol), Polyoxiethylensorbitan Monolaurat (Tween 20; C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>26</sub>; MW 1227,72 g/Mol), Schwefelsäure 95-97%, (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; MW 98,1



- g/Mol), D(+) Glucose und die Substanzen für die gepufferten Salzlösungen zur Analyse, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Adjuvans, CPG2006, TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Deutschland,
- DDT-Hapten 5 (4-{4-[1-(4-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethyl]phenyl}butanoic acid

### ***Allgemeine Lösungen***

Während der Experimente wurden neben den Chemikalien auch Puffer verwendet, Die verwendeten gepufferten Salzlösungen sind im folgenden aufgelistet:

#### Puffer zum Belegen der Mikrotiterplatten (50 mM Carbonatpuffer, pH 9,6 – 9,8)

15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (MW 105,99), 1,59 g

35 mM NaHCO<sub>3</sub> (MW 84,01), 2,94 g

in 1000 mL deionisiertem Wasser lösen.

#### PBS zur Verdünnung der Proben, verschiedene Immunoreagenzien (40 mM PBS, pH 7,6-7,8)

5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (MW 137,99), 0,689 g

35 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (MW 177,99), 6,23 g

100 mM NaCl ( MW 58,44), 5,84 g

in 1000 mL deionisiertem Wasser lösen.

#### PBST zur Verdünnung der Antikörper (40 mM PBST, pH 7,6-7,8)

40 mM PBS + 0,05% (v/v) Tween 20 (0,5 mL l<sup>-1</sup> 40 mM PBS, pH 7,6-7,8)

in 1000 mL deionisiertem Wasser lösen.

#### Waschpuffer (4 mM PBST, pH 7,6-7,8)

40 mM PBS 1:10 verdünnt + 0,05% (v/v) Tween 20

in 1000 mL deionisiertem Wasser lösen.

#### Substratpuffer (100 mM Natriumacetatpuffer), pH 5,5

100 mM Natriumacetat (MW 82,03; wasserfrei), 8,2 g

in 800 mL deionisiertem Wasser lösen, pH mit 1% (w/v) Zitronensäure auf pH 5,5 einstellen und auf 1000 mL auffüllen.

Substratlösungen für die Peroxidase Reaktion

400 µl TMB-StammLösung (mg/mL TMB (MW 240,35) in DMSO; im Dunkeln lagern auf RT, nicht länger als 3-4 Tage.

100 µl 1% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; dies entspricht 0,4 mM TMB und 1,3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
in 25 mL 100 mM Natriumacetatpuffer lösen.

Substratlösungen für die Glucose Oxidase Reaktion

0,25 M D(+) Glucose

0,4 mM TMB

250 nM POD (1 mg/mL in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8)

in 25 mL 100 mM Natriumacetatpuffer lösen.

Abstoppen der Reaktion mit 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

109 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (97%) als Ausgangslösung und auf 1000 mL mit deionisiertem Wasser auffüllen.

***Verschiedene Dialysepuffer und Puffer für die Kopplung***

50 mM Natriumboratpuffer, pH 7,8

Borax (Natriumtetraborat, B<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub> x 10 H<sub>2</sub>O; MW 381,37), 19,07 g

NaCl (0,9%, w/v), 9 g

NaN<sub>3</sub> (0,02%, w/v), 0,2 g

in 1000 mL deionisiertem Wasser lösen, pH wurde mit Borsäure auf 7,8 eingestellt.

Angesetzte Lösung:

A: 0,2 M Boric acid (12,4 g/l)

B: 0,05 M Borax (19,05 g/l)

Ansatz: 50 mL von A + 3,1 mL von B, aufgefüllt auf 200 mL gesamt.

130 mM Natriumcarbonatpuffer, pH 8,1

130 mM NaHCO<sub>3</sub> (MW 84), 10,92 g

in 1000 mL deionisiertem Wasser lösen.

200 mM PBS, pH 7,5-7,8

175 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (MW 177,99), 31,15 g

25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (MW 137,99), 3,45 g

100 mM NaCl (MW 58,44), 5,84 g

in 1000 mL deionisiertem Wasser lösen.

100 mM PBS, pH 7,5-7,8

87,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (MW 177,99), 15,75 g

12,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (MW 137,99), 1,95 g

50 mM NaCl (MW 58,44), 2,92 g

in 1000 mL deionisiertem Wasser lösen.

***Blockierungslösung***

1% (m/v) Milchpulver in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 angesetzt.

Alle Puffersysteme würden in Milli-Q-Wasser, Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland, angesetzt. Die Standardlösungen wurden in Methanol vorbereitet und bei 4 °C gelagert. Die Standardlösungen für den täglichen Gebrauch wurden in Lösungsmittel und/oder 40 mM PBS (pH 7,6-7,8) angesetzt.

**2 Immunosensor**

Während der Experimente wurden Chemikalien und Lösungen verwendet, die im folgenden aufgelistet sind:

***Allgemeine Chemikalien und Lösungen***

- Oyster<sup>®</sup>-645-NHS fluorophor (ein Flakon für 1,5 mg Protein) Denovo Biobels, Münster, Deutschland.
- Low Cross Puffer, Candor Bioscience GmbH, Münster, Deutschland
- Glycin (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>; MW 75,07 g/Mol), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland.

10 mM PBS, pH 7,6-7,8

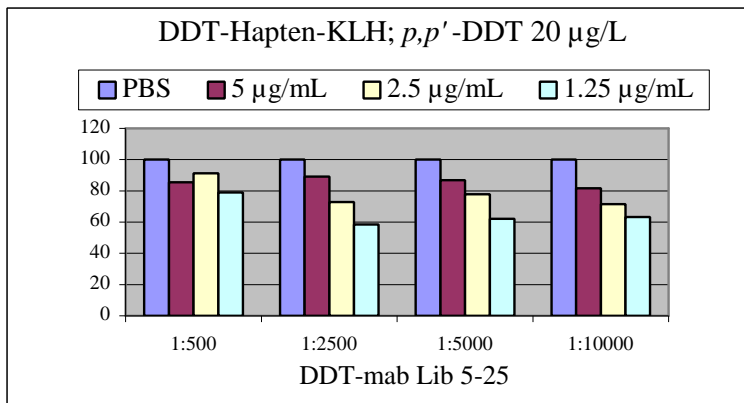
6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (MW 177,99), 1,06 g

4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (MW 137,99), 0,56 g

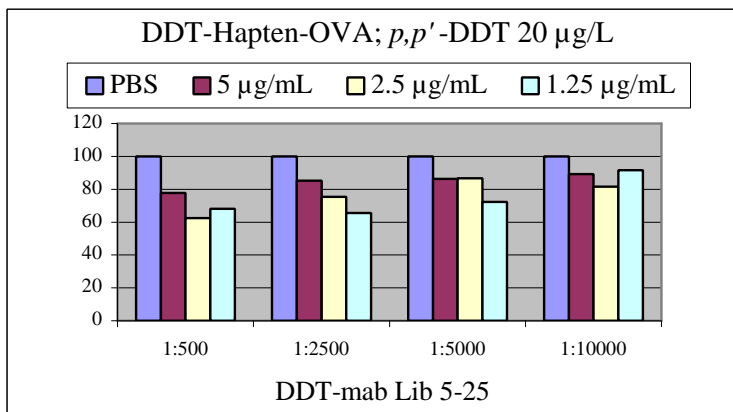
in 1000 mL Milli-Q-Wasser lösen.

## Teil B: Abbildungen und Tabellen

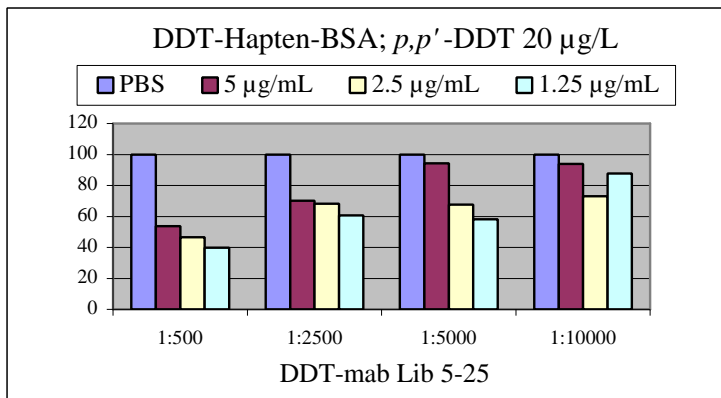
### Abbildungen



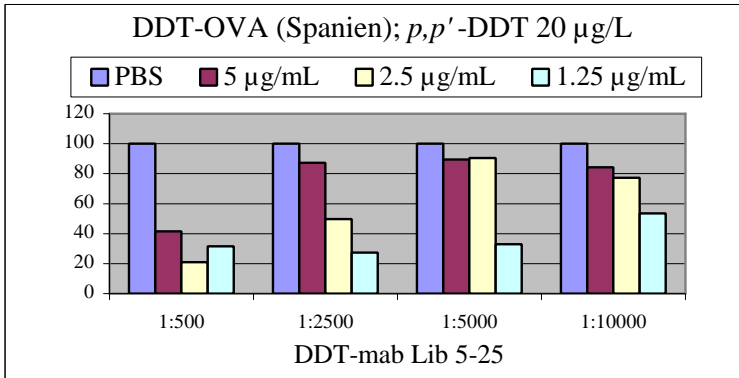
(A)



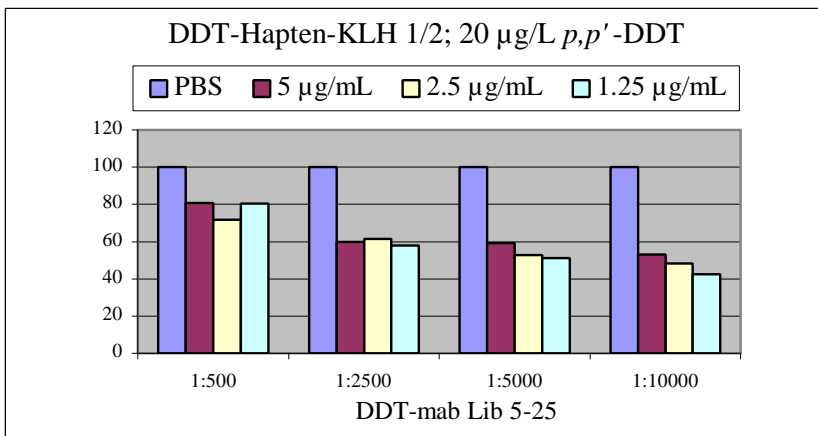
(B)



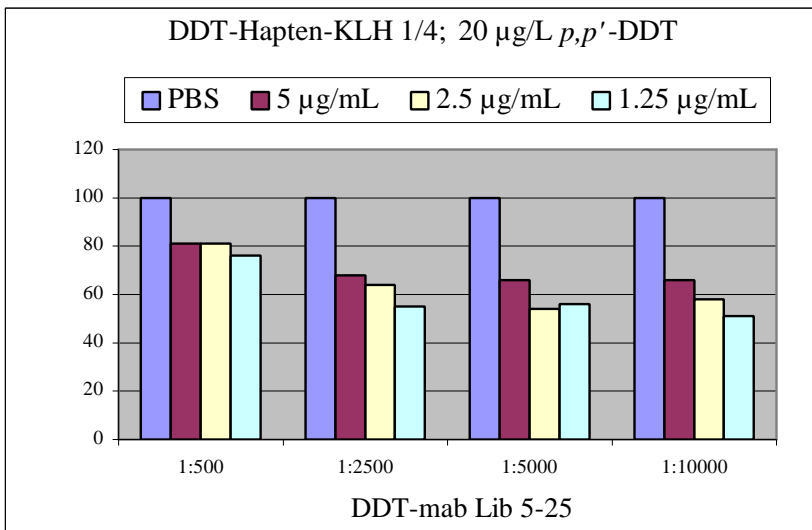
(C)



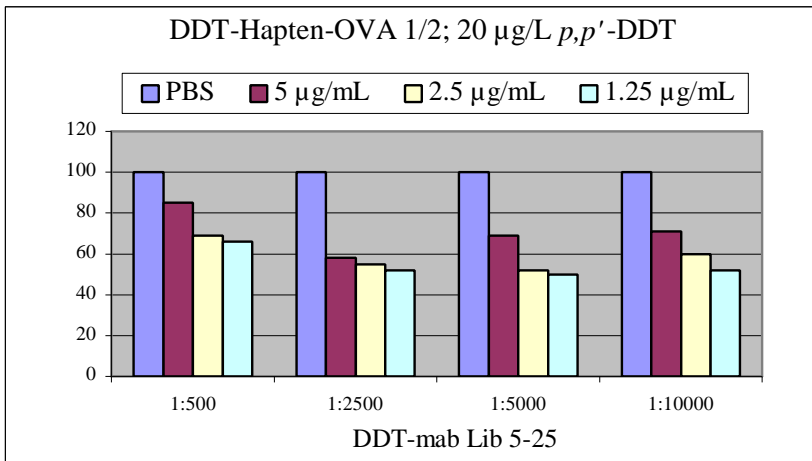
(D)



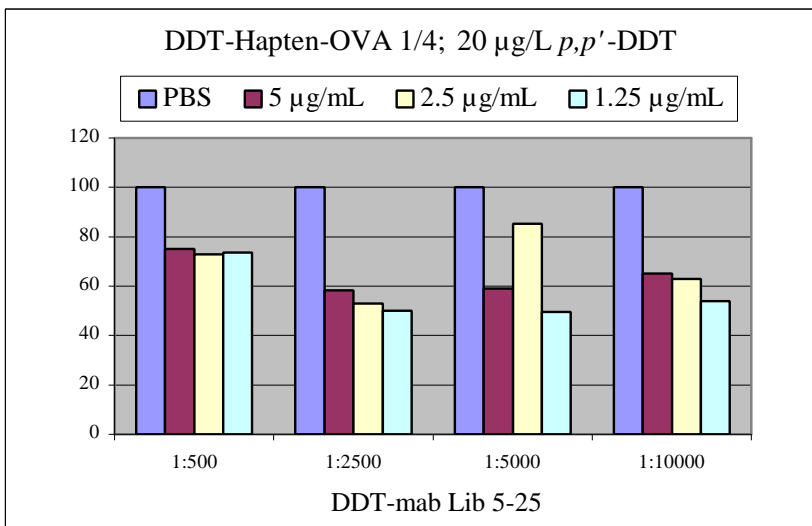
(E)



(F)



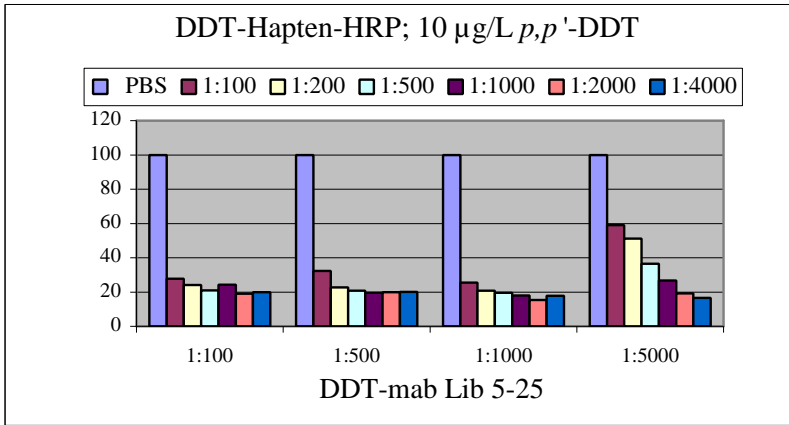
(G)



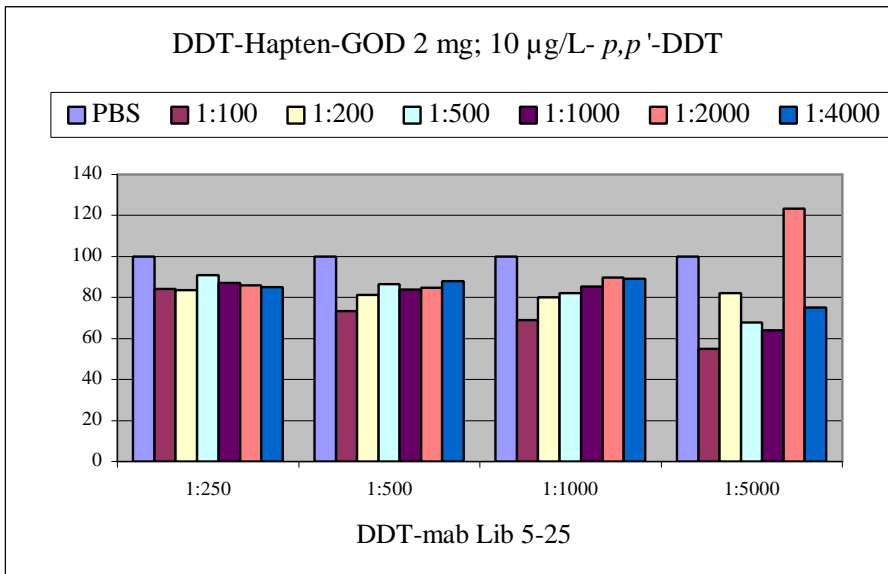
(H)

**Abb. B1: % Control mit DDT-mab Lib 5-25 im Coating Antigen Format-ELISA mit:**

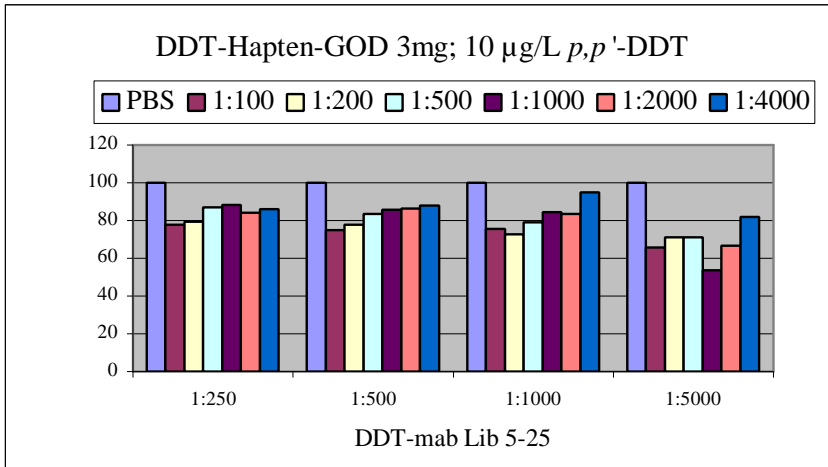
- (A) DDT-Hapten-KLH
- (B) DDT-Hapten-OVA
- (C) DDT-Hapten-BSA
- (D) DDT-OVA (Spanien)
- (E) DDT-Hapten-KLH<sup>1/2</sup>
- (F) DDT-Hapten-KLH<sup>1/4</sup>
- (G) DDT-Hapten-OVA<sup>1/2</sup>
- (H) DDT-Hapten-OVA<sup>1/4</sup>



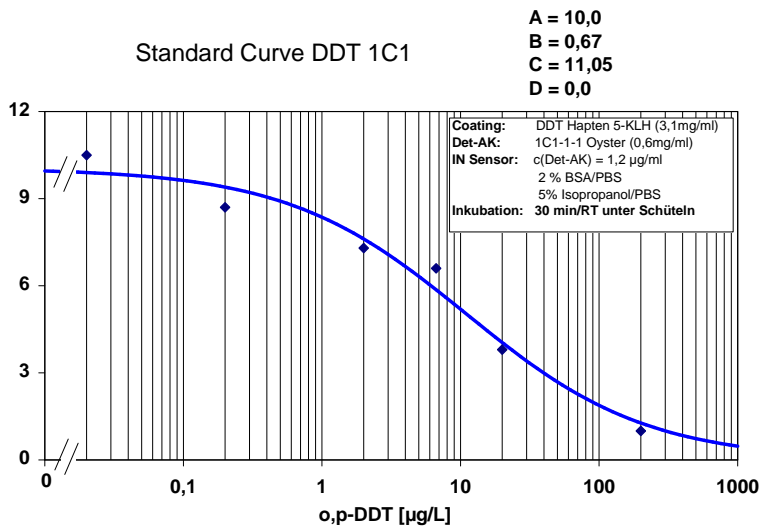
(A)



(B)

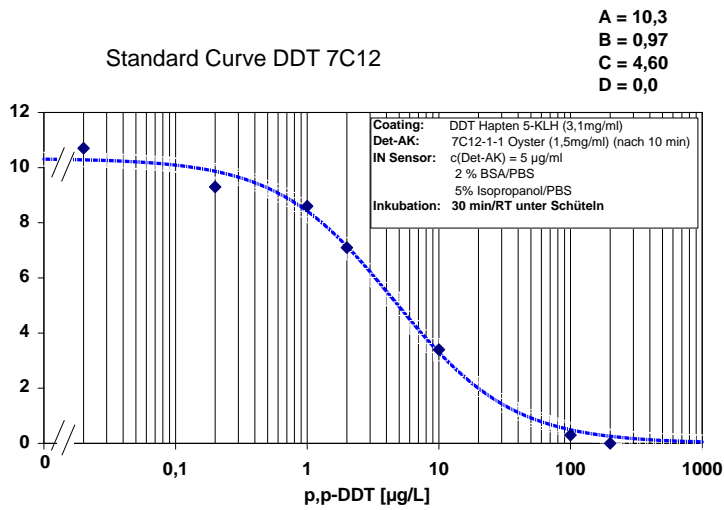


(C)  
**Abb. B2: Enzym Tracer Format-ELISA mit DDT-mab Lib 5-25**  
 (A) DDT-Hapten-HRP  
 (B) DDT-Hapten-GOD (2 mg/mL)  
 (C) DDT-Hapten-GOD (3 mg/mL)

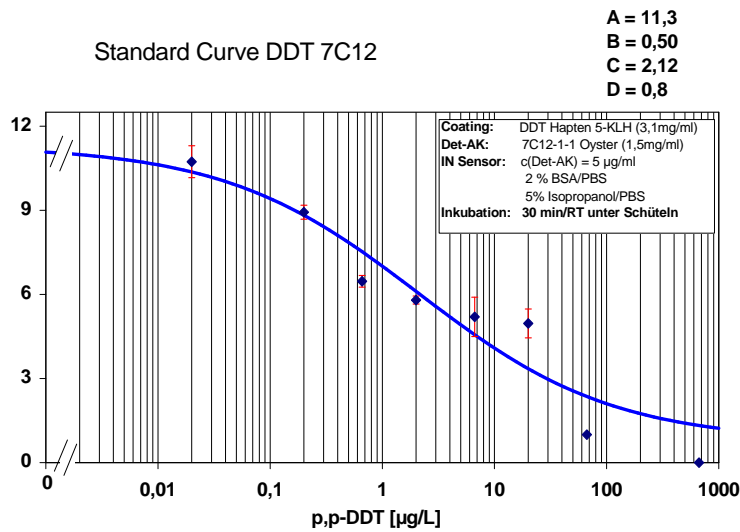


**Abb. B3: AQUA-OPTOSENSOR – Standardkurve für mAk DDT 1C1-Oyster-645 in MS-Excel unter die Formel:  $y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$  ausgewertet.**





(A)

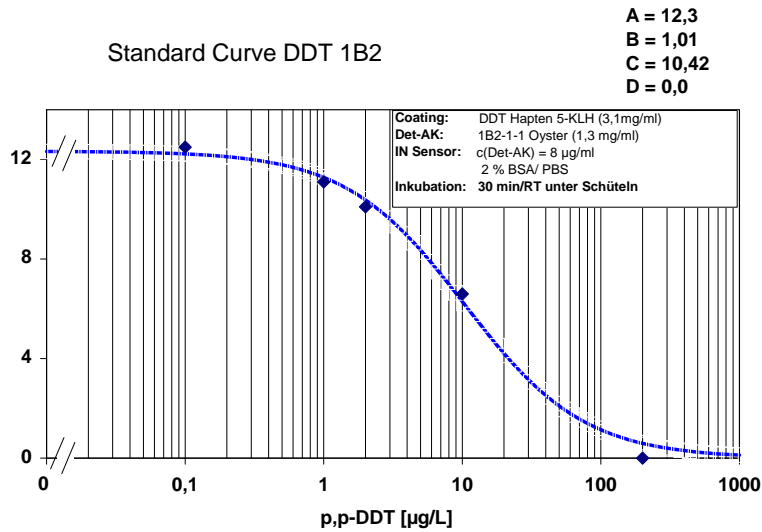


(B)

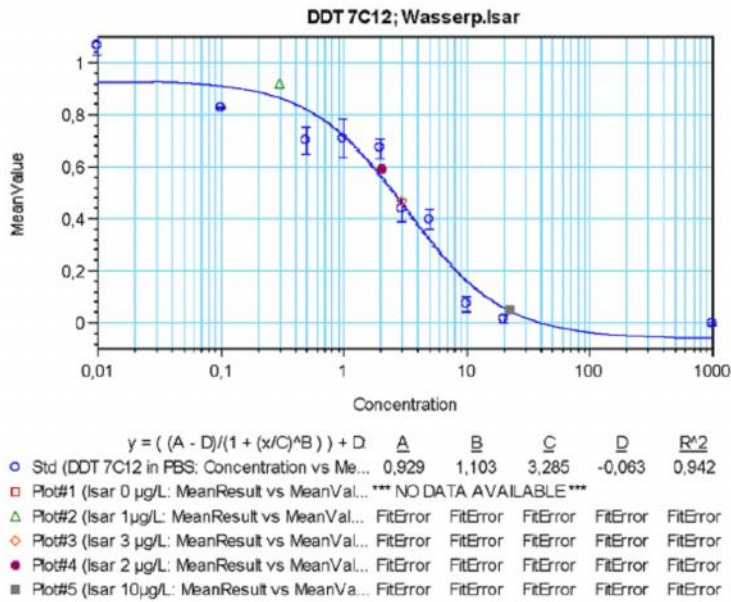
**Abb. B4: AQUA-OPTOSENSOR – Standardkurve für mAk DDT 7C12-Oyster-645 in MS-Excel unter die Formel:  $y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$  ausgewertet.**

(A) n = 1

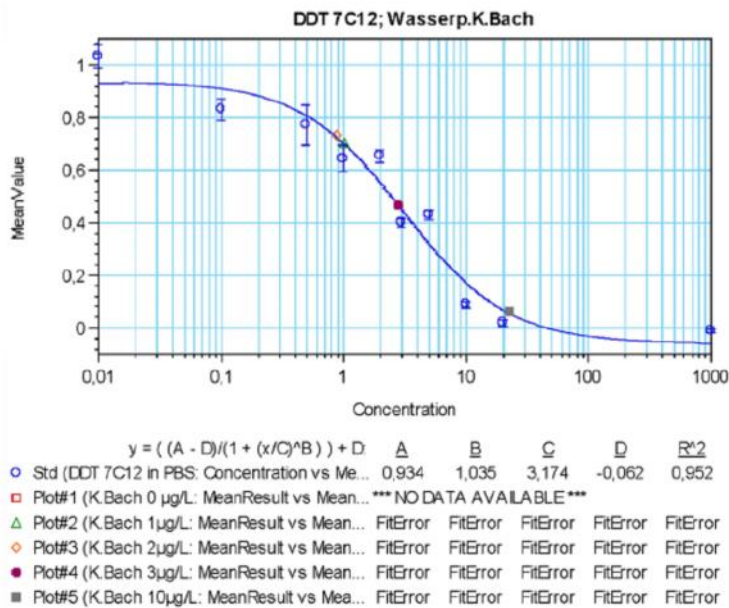
(B) n = 2-3



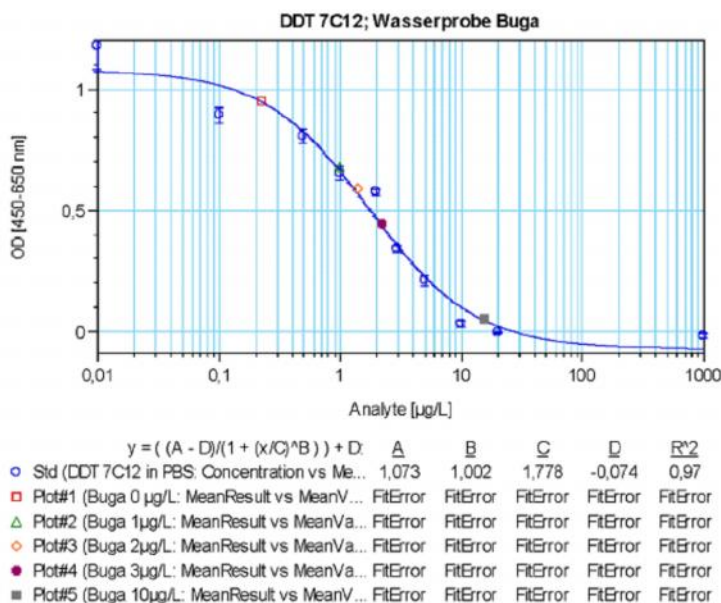
**Abb. B5: AQUA-OPTOSENSOR – Standardkurve für mAk DDT 1B2-Oyster-645 in MS-Excel unter die Formel:  $y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$  ausgewertet.**



(A)



(B)



(C)

**Abb. B6: Standardkurven mit *p,p'*-DDT in ELISA-Format mit mAk DDT 7C12 (125 ng/mL in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8) – Wasserproben aus München: verschiedene Dotierungen: 0, 1, 2, 3 und 10 µL *p,p'*-DDT in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8).**

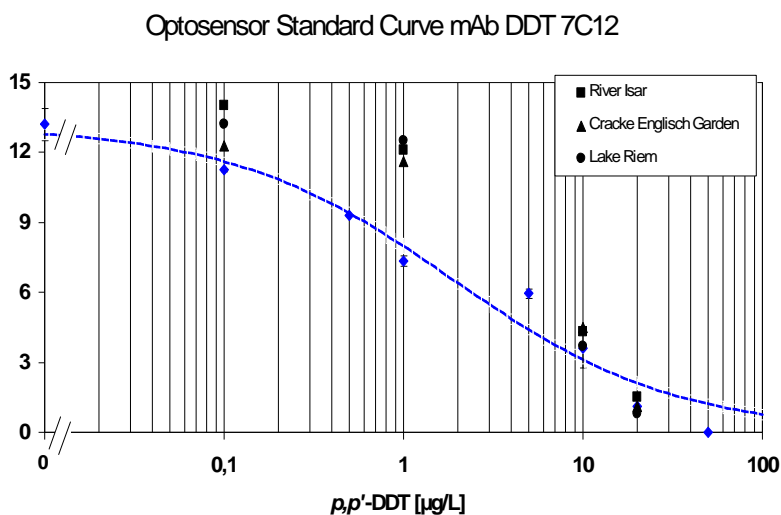
(A) Isar

(B) Riemer See

(C) Bach im Englischen Garten

Die Standardkurven wurden in Softmax Pro unter die Formel:

 $y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$  ausgewertet.



**Abb. B7:** Standardkurven mit  $p,p'$ -DDT in AQUA-OPTOSENSOR-System mit mAb DDT 7C12-Oyster-645 (2  $\mu\text{g/mL}$  in 2% (w/v) BSA in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8) – Wasserproben aus München: verschiedene Dotierungen: 0, 0,1 1, 10 und 20  $\mu\text{L}$   $p,p'$ -DDT in 5% (v/v) Isoproturon/40 mM PBS, pH 7,6-7,8).

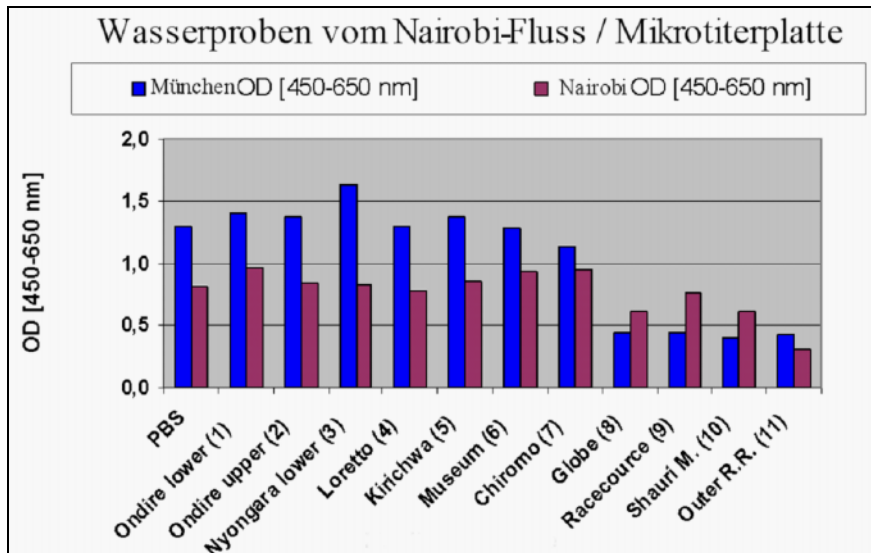
(A) Isar

(B) Riemer See

(C) Bach im Englischen Garten

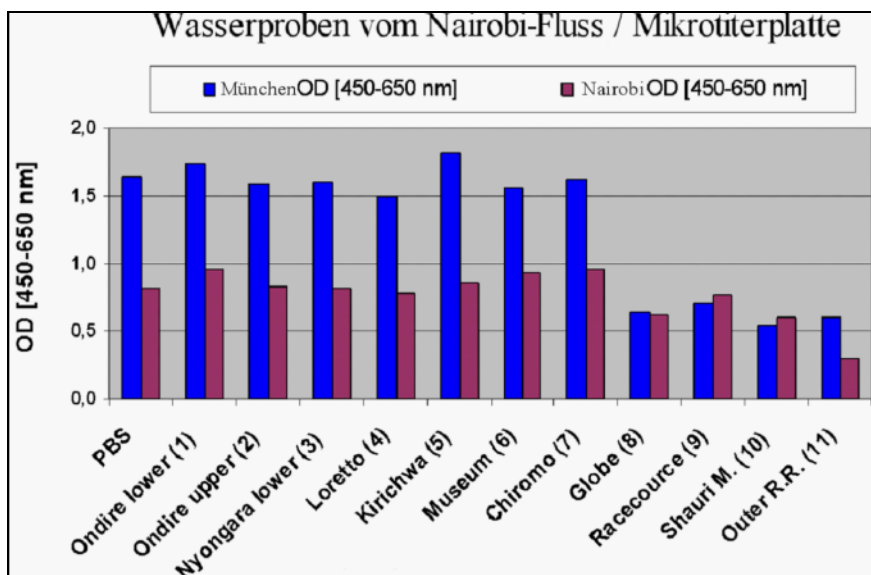
Die Standardkurven wurden in MS-Excel unter die Formel:

$y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$  ausgewertet.



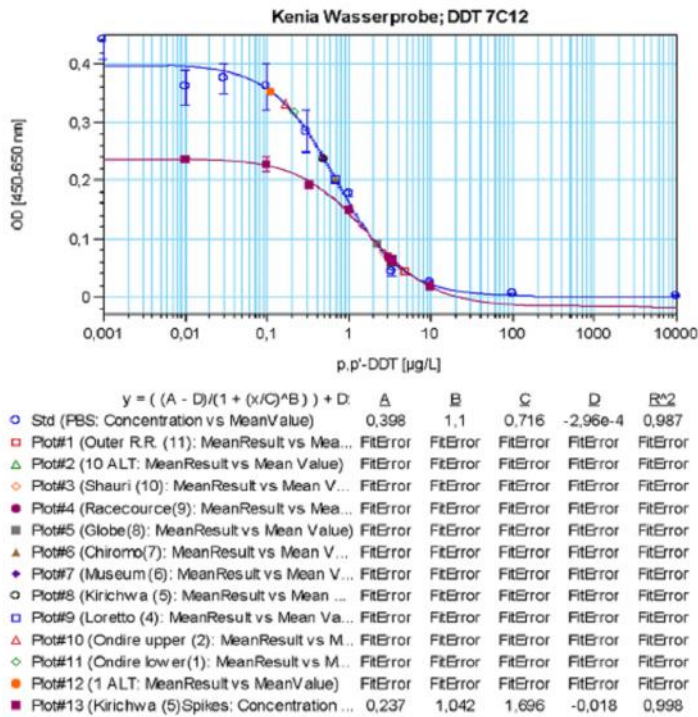
**Abb. B8:** ELISA im Coating Antigen-Format mit Nairobi-Wasserproben mit mAk DDT 7C12

Detaillierte Testbedingungen sind in 1.5.2.1, **Tab. 4** und **Tab. 5**, Material und Methoden dargestellt. Wasserproben von 1 bis 11 und 40 mM PBS, pH 7,6-7,8

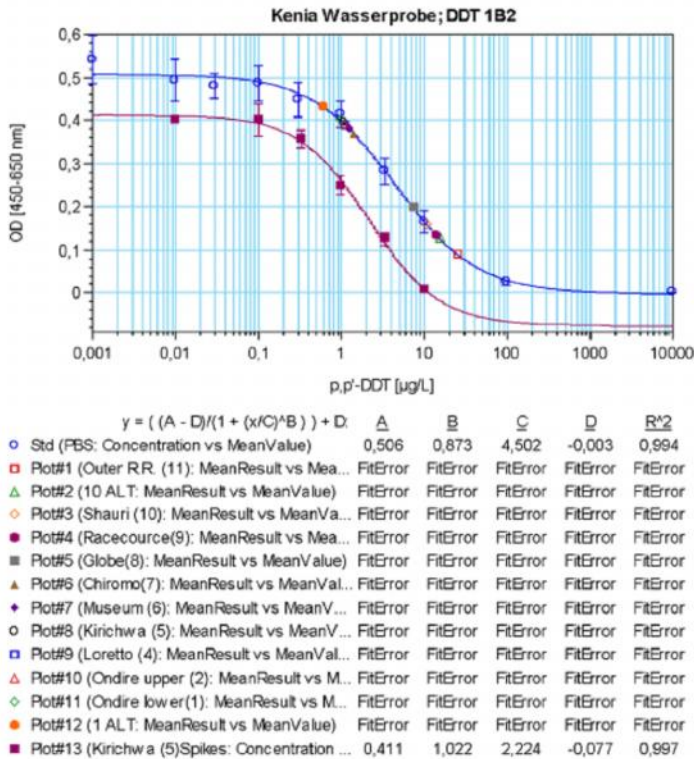


**Abb. B9:** ELISA im Coating Antigen-Format mit Nairobi-Wasserproben mit mAk DDT 1B2

Detaillierte Testbedingungen sind in 1.5.2.1, **Tab. 4** und **Tab. 5**, Material und Methoden dargestellt. Wasserproben von 1 bis 11 und 40 mM PBS, pH 7,6-7,8

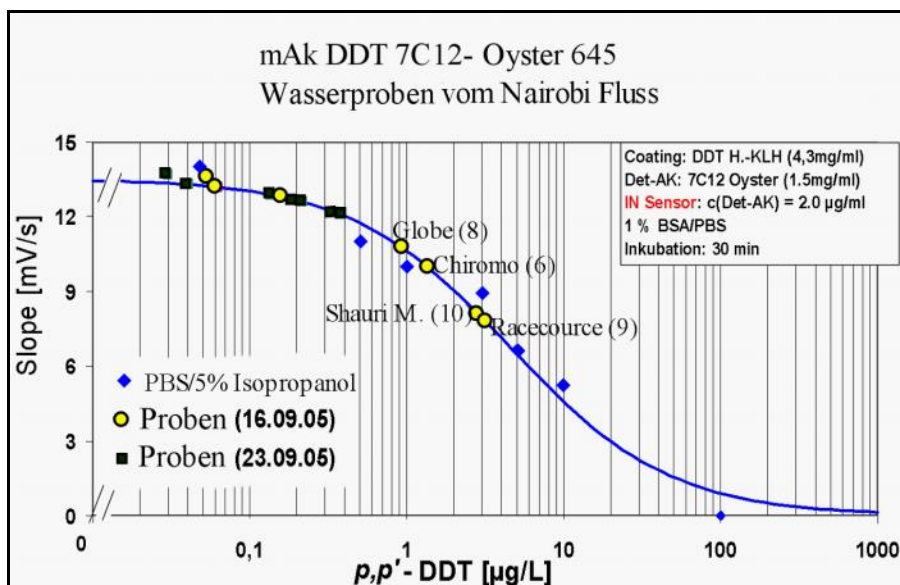


(A)



(B)

**Abb. B10: ELISA im Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP, 1:8.000) mit Nairobi-Wasserproben mit verschiedenen *p,p*-DDT-Dotierungen**  
 (A) mAk DDT 7C12 (125 ng/mL)  
 (B) mAk DDT 1B2 (250 ng/mL)



**Abb. B11: AQUA-OPTOSENSOR mit Nairobi-Wasserproben (mAk DDT 7C12-Oyster-645), Probennahmen am 16.09.05 und 23.09.05**

$p,p'$ -DDT mit anti-DDT mAk 7C12-Oyster<sup>®</sup>-645 (1,5/mL) in 1 (w/v) BSA/40 mM PBS, pH 7,6-7,8: **A** = 13,5; **B** = 0,86; **C** = (IC 50%;  $\mu\text{g/L}$ ) = 4,56;  $R^2 = 0,0$

## Tabellen

**Tab. B1: 4-Parameter-Werte - Optimierung in Enzym Tracer-Format**

mAk DDT 1C1 (300 ng/mL für DDT-Hapten-HRP und 600 ng/mL für DDT-Hapten-GOD)

(A) *o,p'*-DDT in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8; DDT-Hapten-HRP (1:8.000) und DDT-Hapten-GOD (1:1.000)

(B) DDT Metaboliten in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8 DDT-Hapten-HRP (1:8.000)

Bemerkung: Absättigung mit 1% Milchpulver/1h

<i>o,p'</i> -DDT	A	B	C [ $\mu\text{g/L}$ ]	D	R	% CR
DDT-Hapten-HRP	0,554	1,276	<b>0,807</b>	0,002	0,998	<b>100</b>
	0,654	1,386	<b>0,98</b>	-0,002	0,994	<b>100</b>
	0,66	2,068	<b>1,561</b>	0,016	0,998	<b>100</b>
DDT-Hapten-GOD	0,092	1,663	<b>1,461</b>	7,13E-05	0,995	<b>100</b>
	0,345	1,531	<b>1,589</b>	0,002	0,998	<b>100</b>
	0,409	1,572	<b>2,107</b>	0,004	0,994	<b>100</b>

(A)

Analyt	A	B	C [ $\mu\text{g/L}$ ]	D	R	% CR
<i>p,p'</i> -DDT	0,57	0,863	<b>3,585</b>	0,004	0,999	<b>23</b>
<i>p,p'</i> -DDD	0,629	0,785	<b>54,682</b>	-0,003	0,993	<b>2</b>
<i>p,p'</i> -DDE	0,719	1,163	<b>26,219</b>	0,014	0,981	<b>6</b>
<i>o,p'</i> -DDD	0,586	0,930	<b>3,577</b>	0,009	0,998	<b>23</b>

(B)



**Tab. B2: 4-Parameter-Werte - Optimierung in Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP) in verschiedenen Konzentrationen für mAk DDT 1C1 (0,6 mg/mL), 300 ng/mL,**  
**(A)** DDT-Hapten-HRP in 1% Milchpulver (in 40 mM PBS pH 7,6-7,8)  
**(B)** DDT-Hapten-HRP, mAk DDT 1C1 in 1% Milchpulver (in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8)  
**(C)** DDT-Hapten-HRP, in 1% Milchpulver (in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8) und Schütteln  
**(D)** DDT-Hapten-HRP, mAk DDT 1C1 in 40 mM PBS, pH 7,6-7,8

Analyte/Bemerkungen	A	B	C [ $\mu\text{g/L}$ ]	D	R
<i>o,p'</i> -DDT/DDT-Hapten-HRP 1:4.000	0,23	0,841	<b>1,192</b>	0,003	0,990
<i>p,p'</i> -DDT/DDT-Hapten-HRP 1:4.000	0,222	0,402	<b>4,12</b>	-0,006	0,988
<i>o,p'</i> -DDT/DDT-Hapten-HRP 1:8.000	0,187	0,926	<b>0,948</b>	0,003	0,989
<i>p,p'</i> -DDT/DDT-Hapten-HRP 1:8.000	0,201	0,640	<b>6,784</b>	0,006	0,994

(A)

Analyte/Bemerkungen	A	B	C [ $\mu\text{g/L}$ ]	D	R
<i>o,p'</i> -DDT/DDT-Hapten-HRP 1:4.000	0,434	1,637	<b>1,201</b>	0,014	0,998
<i>p,p'</i> -DDT/DDT-Hapten-HRP 1:4.000	0,441	0,691	<b>5,409</b>	0,008	0,995
<i>o,p'</i> -DDT/DDT-Hapten-HRP 1:8.000	0,460	1,269	<b>0,908</b>	0,002	0,998
<i>p,p'</i> -DDT/DDT-Hapten-HRP 1:8.000	0,482	0,708	<b>5,459</b>	0,001	0,998

(B)

Analyte/Bemerkungen	A	B	C [ $\mu\text{g/L}$ ]	D	R
<i>o,p'</i> -DDT/DDT-Hapten-HRP 1:4.000	0,242	1,014	<b>1,421</b>	0,016	0,992
<i>p,p'</i> -DDT/DDT-Hapten-HRP 1:4.000	0,226	0,518	<b>5,019</b>	0,008	0,989
<i>o,p'</i> -DDT/DDT-Hapten-HRP 1:8.000	0,200	1,213	<b>1,050</b>	0,008	0,989
<i>p,p'</i> -DDT/DDT-Hapten-HRP 1:8.000	0,223	0,487	<b>7,733</b>	-0,004	0,993

(C)

Analyte/Bemerkungen	A	B	C [ $\mu\text{g/L}$ ]	D	R
<i>o,p'</i> -DDT DDT-Hapten-HRP 1:4.000	0,405	1,075	<b>0,891</b>	0,008	0,997
<i>p,p'</i> -DDT DDT-Hapten-HRP 1:4.000	0,39	0,491	<b>4,78</b>	-0,004	0,997
<i>o,p'</i> -DDT DDT-Hapten-HRP 1:8.000	0,368	1,129	<b>0,813</b>	0,001	0,993
<i>p,p'</i> -DDT DDT-Hapten-HRP 1:8.000	0,408	0,626	<b>6,880</b>	-0,005	0,996

(D)

**Tab. B3: 4-Parameter-Werte für  $p,p'$ -DDT in 40 mM PBS (pH 7,6-7,8) - Optimierungen in Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD) mit mAk DDT 7C12 in 1% Milchpulver**

A	B	C [ $\mu\text{g/L}$ ]	D	R	% CR	Bemerkung
0,562	1,011	<b>0,574</b>	0,017	0,993	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:8.000</b> mAk DDT 7C12 (125 ng/mL)
0,331	0,951	<b>0,684</b>	0,027	0,996	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:4.000</b> mAk DDT 7C12 (125 ng/mL)
0,413	1,252	<b>0,557</b>	-2,53E-04	0,994	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:8.000</b> mAk DDT 7C12(100 ng/mL)
0,617	1,187	<b>0,488</b>	4,00E-03	0,992	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:10.000</b> mAk DDT 7C12(125 ng/mL)
0,326	1,576	<b>0,29</b>	0,003	0,998	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:1.000</b> mAk DDT 7C12 (125 ng/mL)
0,276	1,784	<b>0,297</b>	0,006	0,984	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:10.000</b> mAk DDT 7C12(125 ng/mL) in 3% Milchpulver
0,423	1,609	<b>0,314</b>	0,008	0,993	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:10.000</b> mAk DDT 7C12(125 ng/mL) in 0,1% Milchpulver
0,364	1,894	<b>0,339</b>	0,011	0,983	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:10.000</b> mAk DDT 7C12 (125 ng/mL) in 0,5% Milchpulver
0,291	1,782	<b>0,324</b>	0,006	0,992	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:10.000</b> mAk DDT 7C12 (125 ng/mL) in PBS; Absättigung 1h/mit 1% Milchpulver
0,223	1,969	<b>0,26</b>	0,004	0,988	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:15.000</b> mAk DDT 7C12 (125 ng/mL) in PBS; Absättigung 1h/mit 1% Milchpulver
0,721	1,14	<b>1,301</b>	0,005	1	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:8.000</b> mAk DDT 7C12 (125 ng/mL)
0,205	1,243	<b>0,995</b>	0,003	1	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-GOD 1:1.000</b> mAk DDT 7C12 (300 ng/mL)
0,731	1,368	<b>1,977</b>	0,003	0,998	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-GOD 1:1.000</b> mAk DDT 7C12(1000 ng/mL)
0,209	1,198	<b>0,627</b>	4,43E-04	0,982	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-GOD 1:1.000</b> mAk DDT 7C12(250 ng/mL)
0,082	1,179	<b>0,55</b>	-0,002	0,994	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-GOD 1:100</b> mAk DDT 7C12 (125 ng/mL)
0,54	1,498	<b>1,498</b>	0,005	0,995	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-GOD 1:1.000</b> mAk DDT 7C12(500ng/mL)

**Tab. B4: 4-Parameter-Standardkurven für *p,p'*-DDT in 40 mM PBS (pH 7,6-7,8) - Optimierungen in Enzym Tracer-Format (DDT-Hapten-HRP und DDT-Hapten-GOD) mit mAk DDT 1B2**

A	B	C [µg/L]	D	R	% CR	Bemerkung
0,315	0,382	<b>49,674</b>	0,037	0,913	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:250</b> mAk DDT 1B2 (125 ng/mL) in 1% Milchpulver
0,514	0,341	<b>1,641</b>	0,098	0,979	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:250</b> mAk DDT 1B2 (500 ng/mL) in 1% Milchpulver
0,686	0,956	<b>1,062</b>	0,109	0,966	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:500</b> mAk DDT 1B2 (500 ng/mL) in 3% Milchpulver
0,821	0,88	<b>0,937</b>	0,126	0,958	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:500</b> mAk DDT 1B2 (500ng/mL) in 0,1% Milchpulver
0,691	0,803	<b>0,932</b>	0,107	0,967	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:500</b> mAk DDT 1B2 (500 ng/mL) in 40 mM PBS, Absättigung 1h/mit 1% Milchpulver
0,854	0,72	<b>1,549</b>	0,073	0,953	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:1.000</b> mAk DDT 1B2 (500 ng/mL) in 40 mM PBS, Absättigung 1h/mit 1% Milchpulver
1,502	0,645	<b>3,058</b>	0,147	0,988	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:500</b> mAk DDT 1B2 (500 ng/mL) in 1% Milchpulver
0,555	0,868	<b>120,58</b>	-0,009	0,996	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:4.000</b> 1% in LowCross Buffer
0,786	0,856	<b>5,772</b>	0,081	0,982	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:1.000</b> mAk DDT 1B2 (250 ng/mL) in 1% Milchpulver
0,777	0,851	<b>6,537</b>	0,08	0,992	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-HRP 1:1.000</b> mAk DDT 1B2 (250 ng/mL) in 1% Milchpulver
0,312	0,823	<b>9,267</b>	-0,003	0,989	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-GOD 1:1.000</b> mAk DDT 1B2 (1000 ng/mL) in 1% Milchpulver
0,45	0,976	<b>10,51</b>	0,001	0,995	<b>100</b>	<b>DDT-Hapten-GOD 1:1.000</b> mAk DDT 1B2 (1.000 ng/mL) in 1% Milchpulver

**Tab. B5: Enzym Tracer-Format mit mAk DDT 1C1 (300 ng/mL), mAk DDT 1B2 (250 ng/mL), mAk DDT 7C12 (125 ng/mL), mit DDT-Hapten-HRP (1:4.000)**

Analyte	mAks	A	B	C [µg/L]	D	R
<i>o,p'</i> -DDT in 10% MeOH	<b>1C1</b>	0,334	0,752	0,764	-0,006	0,984
<b><i>o,p'</i>-DDT in PBS</b>		<b>0,279</b>	<b>0,867</b>	<b>1,276</b>	<b>-0,004</b>	<b>0,973</b>
<i>o,p'</i> -DDT in 20% MeOH		0,263	0,925	0,958	0,01	0,995
<i>p,p'</i> -DDT in 10% MeOH	<b>1B2</b>	1,178	1,686	11,965	0,076	0,99
<b><i>p,p'</i>-DDT in PBS</b>		<b>1,061</b>	<b>1,13</b>	<b>9,25</b>	<b>0,002</b>	<b>0,998</b>
<i>p,p'</i> -DDT in 20% MeOH		0,862	1,965	10,098	0,062	0,983
<i>p,p'</i> -DDT in 10% MeOH	<b>7C12</b>	1,177	1,149	0,533	-0,001	0,988
<b><i>p,p'</i>-DDT in PBS</b>		<b>1,073</b>	<b>0,742</b>	<b>0,341</b>	<b>-0,032</b>	<b>0,97</b>
<i>p,p'</i> -DDT in 20% MeOH		0,935	3,283	2,109	0,019	0,985
<i>o,p'</i> -DDT in 30% MeOH	<b>1C1</b>	0,443	0,534	0,826	-0,012	0,964
<b><i>o,p'</i>-DDT in PBS</b>		<b>0,88</b>	<b>0,995</b>	<b>2,108</b>	<b>-0,015</b>	<b>0,992</b>
<i>o,p'</i> -DDT in 40% MeOH		0,298	0,752	1,404	0,004	0,993
<i>p,p'</i> -DDT in 30% MeOH	<b>1B2</b>	0,161	0,362	7,331	-0,007	0,956
<b><i>p,p'</i>-DDT in PBS</b>		<b>0,899</b>	<b>0,862</b>	<b>6,761</b>	<b>-0,014</b>	<b>0,996</b>
<i>p,p'</i> -DDT in 40% MeOH		0,164	0,355	2,484	-0,004	0,986
<i>p,p'</i> -DDT in 30% MeOH	<b>7C12</b>	0,303	0,769	1,577	-6,22e-4	0,993
<b><i>p,p'</i>-DDT in PBS</b>		<b>0,927</b>	<b>1,681</b>	<b>1,378</b>	<b>0,005</b>	<b>0,994</b>
<i>p,p'</i> -DDT in 40% MeOH		0,446	0,977	0,659	0,009	0,998
<i>o,p'</i> -DDT in 5% ACN	<b>1C1</b>	0,822	1,589	2,748	0,012	0,996
<b><i>o,p'</i>-DDT in PBS</b>		<b>0,829</b>	<b>1,392</b>	<b>2,396</b>	<b>0,003</b>	<b>0,994</b>
<i>o,p'</i> -DDT in 10% ACN		0,633	1,182	5,661	0,022	0,99
<i>p,p'</i> -DDT in 5% ACN	<b>1B2</b>	0,833	1,145	25,15	0,003	0,995
<b><i>p,p'</i>-DDT in PBS</b>		<b>0,861</b>	<b>1,254</b>	<b>20,16</b>	<b>0,001</b>	<b>0,993</b>
<i>p,p'</i> -DDT in 10% ACN		0,512	1,345	44,79	0,007	0,91
<i>p,p'</i> -DDT in 5% ACN	<b>7C12</b>	0,739	1,226	1,11	0,004	0,999
<b><i>p,p'</i>-DDT in PBS</b>		<b>0,682</b>	<b>1,302</b>	<b>1,748</b>	<b>-0,002</b>	<b>0,982</b>
<i>p,p'</i> -DDT in 10% ACN		0,636	1,069	1,947	0,011	0,996
<i>o,p'</i> -DDT in 5% MeOH	<b>1C1</b>	0,679	1,009	1,055	-0,008	0,989
<b><i>o,p'</i>-DDT in PBS</b>		<b>0,618</b>	<b>1,28</b>	<b>1,012</b>	<b>6,6e-4</b>	<b>0,985</b>
<i>o,p'</i> -DDT in 2% ACN		0,68	1,103	0,996	-0,004	0,979
<i>p,p'</i> -DDT in 5% MeOH	<b>1B2</b>	0,664	0,905	8,962	-0,012	0,982
<b><i>p,p'</i>-DDT in PBS</b>		<b>0,67</b>	<b>0,875</b>	<b>6,193</b>	<b>-0,01</b>	<b>0,993</b>
<i>p,p'</i> -DDT in 2% ACN		0,705	0,777	17,407	-0,016	0,982
<i>p,p'</i> -DDT in 5% MeOH	<b>7C12</b>	0,572	1,284	0,643	0,011	0,981
<b><i>p,p'</i>-DDT in PBS</b>		<b>0,584</b>	<b>1,067</b>	<b>0,946</b>	<b>-0,004</b>	<b>0,983</b>
<i>p,p'</i> -DDT in 2% ACN		0,707	0,865	1,141	-0,015	0,972

**Tab. B6: Zusammenfassung AQUA-OPTOSENSOR – DDT 7C12-Oyster® -645 – 4-Parametergleichung (in MS-Excel ausgewertet)**

<b>Bemerkung</b>	<b>Konzentration <i>p,p'</i>-DDT</b>	<b>Slope [mV/s]</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C [µg/L]</b>	<b>D</b>
DDT 7C12-Oyster 10 µg/mL in 2% BSA/PBS	0,02	10,7	10,8	0,73	2,71	0,0
	0,2	9,3				
	1	7,1				
	2	6,1				
	10	3,4				
	100	0,3				
	200	0,0				
DDT 7C12-Oyster 2,5 µg/mL in 2% BSA/PBS	0,02	13,6	13,9	0,52	3,08	0,0
	0,2	10,0				
	2	8,0				
	20	5,3				
	100	0				
DDT 7C12-Oyster 5 µg/mL in 2% BSA/PBS	0,01	10,7	10,3	0,79	3,42	0,0
	0,1	9,3				
	0,5	8,6				
	1	7,1				
	5	5,0				
	50	0,9				
	100	0,0				
DDT 7C12-Oyster 2 µg/mL in 2% BSA/PBS	0,01	13,6	14,2	0,50	1,28	0,0
	0,1	10,6				
	1	6,6				
	10	5,8				
	100	0,2				
DDT 7C12-Oyster 0,7 µg/mL in 2% BSA/PBS	0,01	9,5	8,9	0,81	5,43	0,0
	0,1	8,4				
	0,33	7,4				
	1	7,0				
	3,33	5,9				
	10	3,5				
	33,33	1,1				
	DDT 7C12-Oyster (n=3) 5 µg/mL in 2% BSA/PBS <b>Mean Value</b>	0,02				
0,2		8,9				
0,66		6,5				
2		5,8				
6,66		5,2				
20,000		4,967				
66,66		1,0				
666,660		0,000				
7C12-Oyster 5 µg/mL in 2% BSA/PBS	0,001	6,0	5,6	0,55	4,40	0,0
	0,01	5				
	0,1	4,8				
	1	3,9				
	25	2				

Fortsetzung **Tab. B6:**

<b>Bemerkung</b>	<b>Konzentration <i>p,p'</i>-DDT</b>	<b>Slope [mV/s]</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C [µg/L]</b>	<b>D</b>
	50	1,4				
	100	0,0				
DDT 7C12-Oyster ( <b>n=2</b> )	0,01	13,20	13,1	0,70	1,88	0,0
0,7 µg/mL in 2% BSA/PBS	0,1	11,25				
<b>MeanValue</b>	0,5	9,30				
	1	7,35				
	5	5,95				
	10	3,60				
	20	1,10				
	50	0,00				
DDT 7C12-Oyster ( <b>n=2</b> )	0,01	9,4	8,7	1,14	5,27	0,0
0,7 µg/mL in 2% BSA/PBS	0,1	8,5				
<b>MeanValue</b>	0,33	7,9				
	1	7,3				
	3,33	5,9				
	10	2,750				
	33,33	0,7				
DDT 7C12-Oyster	0,05	12,5	12,3	1,01	5,21	0,0
2,5 µg/mL in 2% BSA/PBS	0,5	11,1				
	1	10,1				
	5	6,6				
	100	0,0				

**Tab. B7: Zusammenfassung AQUA-OPTOSENSOR - DDT 1C1-Oyster®-645 – 4-Parametergleichung (in MS-Excel ausgewertet)**

<i>o,p'</i> -DDT[µg/L]	<b>mAk DDT 1C1-Oyster-645</b>		
	<i>o,p'</i> -DDT		
	<b>Position</b>	<b>Slope [mV/s]</b>	<b>Time</b>
5% (v/v) Isopropanol /40 mM PBS, pH 7,6-7,8	102-125	10,5	15-52
0,2	101-125	8,7	39-71
2	107-136	7,3	39-71
6,66	97-126	6,6	39-71
20	98-130	3,8	12-69
200	104-143	2,0	12-69

**Tab. B8: Zusammenfassung AQUA-OPTOSENSOR - DDT 7C12-Oyster® -645 – 4-Parametergleichung (in MS-Excel ausgewertet); *p,p'*-DDT in 5% (v/v) Isopropanol/40 mM PBS (pH 7,6-7,8)**  
**(A) n = 1 (s. Abb. B6 (B))**  
**(B) n = 2-3 (s. Abb. B6 (B))**

<i>p,p'</i> -DDT[ $\mu\text{g/L}$ ]	mAk DDT 7C12-Oyster-645		
	<i>Position</i>	<i>Slope</i> [mV/s]	<i>Time</i>
5% Isopropanol/PBS	99-123	10,7	7-44
0,2	104-128	9,3	7-44
1	99-121	8,6	7-44
2	105-129	7,1	42-83
10	106-124	5,0	54-91
100	103-121	0,9	32-69
200		0,0	

(A)

<i>p,p'</i> -DDT[ $\mu\text{g/L}$ ]	mAk DDT 7C12-Oyster-645		
	<i>Position</i>	<i>Slope</i> [mV/s]	<i>Time</i>
5% Isopropanol/PBS	104-139	11,2	34-69
5% Isopropanol/PBS	97-127	10,9	34-69
5% Isopropanol/PBS	107-130	10,1	34-69
0,2	99-127	9,2	34-69
0,2	99-127	8,7	34-69
0,2	105-135	8,9	34-69
0,66	104-127	6,7	34-69
0,66	108-127	6,4	34-69
0,66	105-124	6,3	34-69
2	107-137	5,7	34-69
2	96-128	5,9	34-69
6,66	106-125	5,5	15-52
6,66	108-129	5,7	34-69
6,66	107-127	4,4	34-69
20	95-129	4,4	34-69
20	98-127	5,4	34-69
20	102-129	5,1	34-69
66,66	113-135	1,0	34-69
66,66	117-134	1,0	34-69
666,66		0	
666,66		0	

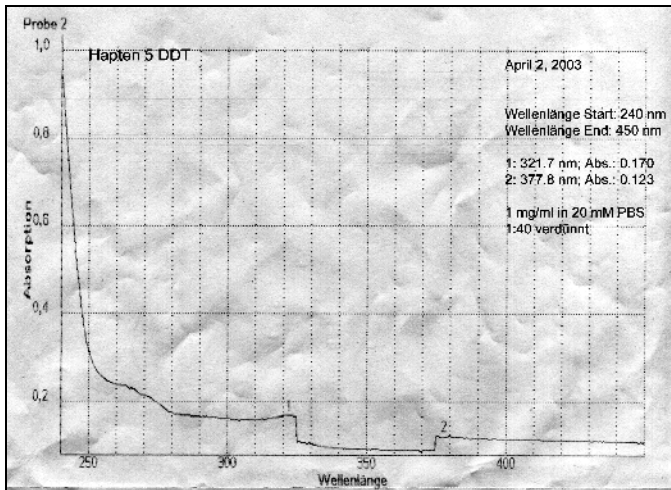
(B)

**Tab. B9: Zusammenfassung AQUA-OPTOSENSOR – DDT 1B2-Oyster®-645**  
 – 4-Parametergleichung (in MS-Excel ausgewertet); in 5% (v/v) Isopropanol/40 mM PBS (pH 7,6-7,8)

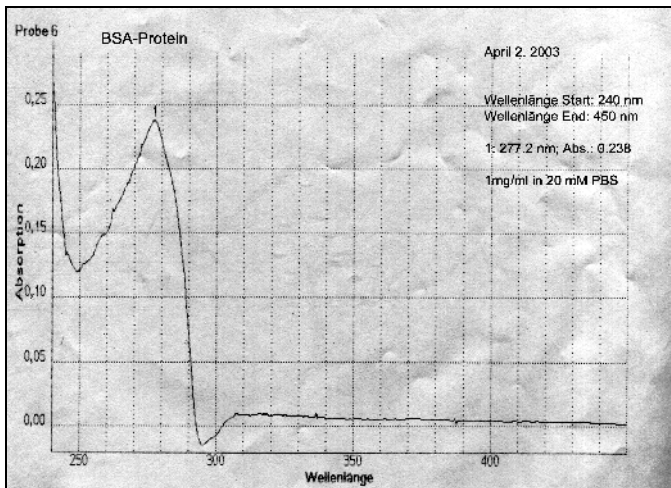
Analyte <i>p,p'</i> -DDT[ $\mu\text{g/L}$ ]	Ergebniss / mAk DDT 1B2-Oyster-645		
	<i>Position</i>	<i>Slope [mV/s]</i>	<i>Time</i>
PBS	101-122	12,5	27-61
1	108-135	11,1	59-105
2	104-131	10,1	47-88
10	105-126	6,6	47-79
200		0	



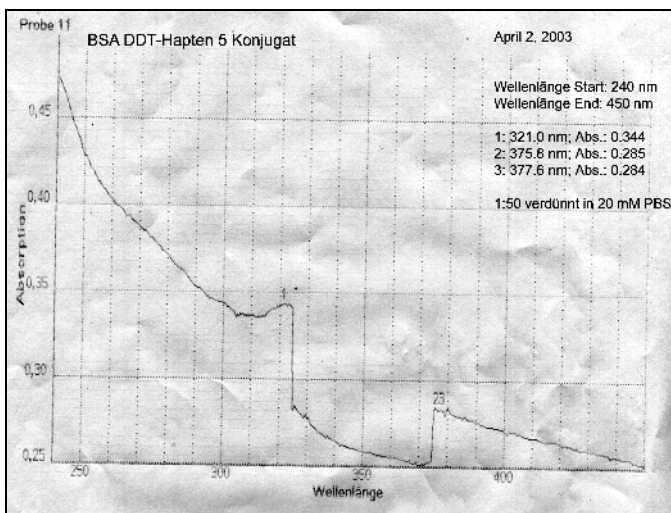
## Teil C: Spektren



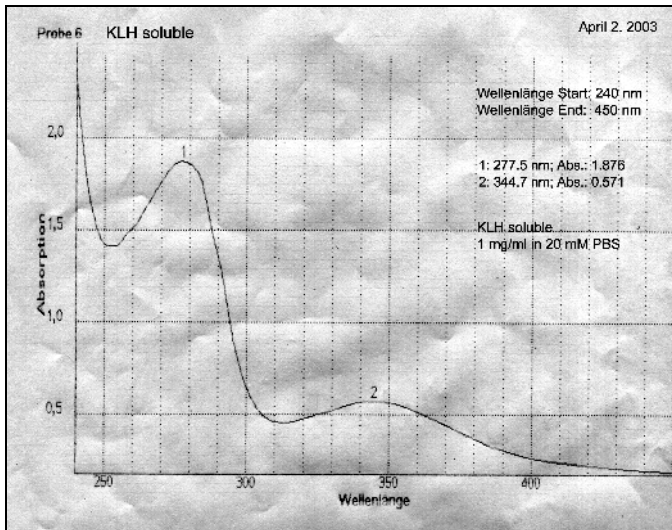
(A)



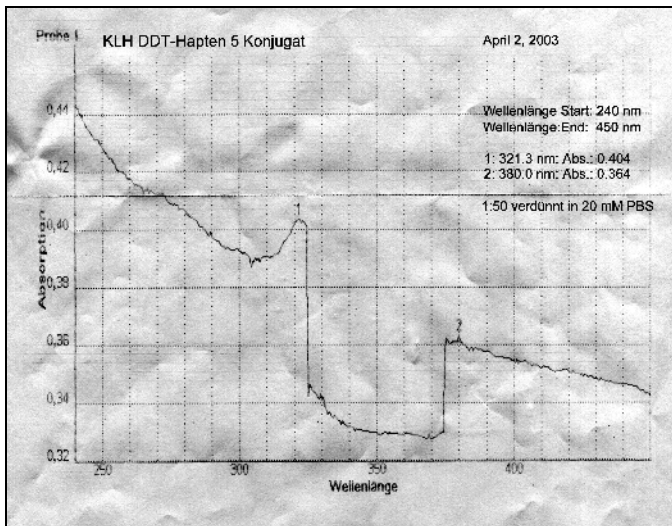
(B)



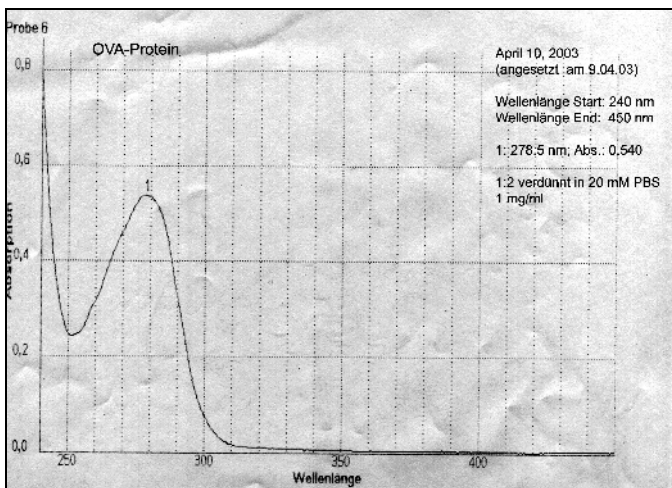
(C)



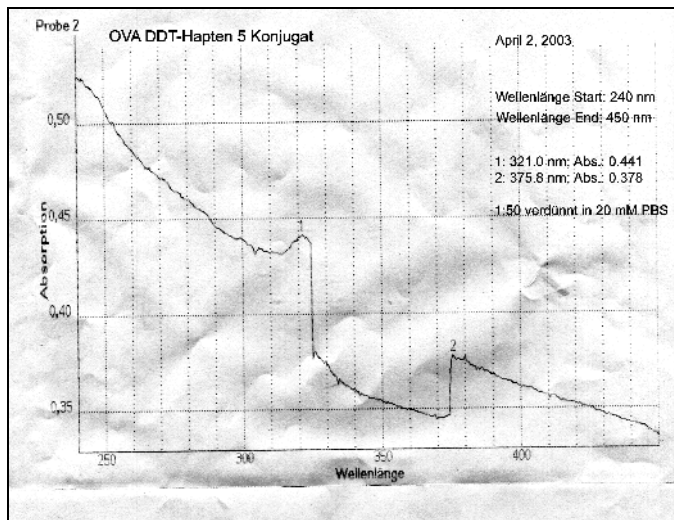
(D)



(E)



(F)



(G)

**Abb. C1:** Übersicht zu den UV-Spektren

- (A) DDT-Hapten
- (B) BSA-Protein
- (C) DDT-Hapten-BSA
- (D) KLH-Protein
- (E) DDT-Hapten-KLH
- (F) OVA-Protein
- (G) DDT-Hapten-OVA

## **LEBENS LAUF**

Cristina Mihaela Weber, geb. Morar  
Geboren am 29.12.1973 in Klausenburg / Rumänien  
Staatsangehörigkeit: rumänisch

### **Schulbildung**

1980 - 1988 Grund- und Hauptschule in Klausenburg / Rumänien  
1988 - 1992 Gymnasium für Lebensmitteltechnologie in Klausenburg / Rumänien  
1992 - 1995 Berufsschule für Lebensmitteltechnologanten in Klausenburg / Rumänien (parallel zum Studium)

### **Studium**

1993 - 1998 Universität Klausenburg für Agrarwissenschaften und Veterinärmedizin  
Fachrichtung: Biotechnologie  
Titel der Diplomarbeit Charakteristischer Einfluss biochemischer und mikrobiologischer Partikel in der Herstellung von Milch und Milchprodukten“  
Abschluss: Lizentiat Diplom (Ingenieurin)

### **Zusatzstudium**

1995 - 1996 Universität Klausenburg für Agrarwissenschaften und Veterinärmedizin  
Abschluss: Lehrer Ausbildung und Pädagogikexamen

### **Berufspraxis**

2001 - 2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Technischen Universität München, WZW, Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik  
GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg, Institut für Ökologische Chemie

### **Promotion**

Juli 2003 - Juli 2006 An der Technischen Universität, München, WZW, Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik  
GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg, Institut für Ökologische Chemie  
Titel der Dissertation len Antikörpern für Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) und deren Einsatz im konventionellen ELISA und in einem optischen Immunosensor“.