

Kapillar-Immuno-Assay mit Elektrochemischer Detektion

A. Rose¹, C. Nistor², J. Emnéus², D. Pfeiffer³, F.W. Scheller¹, U. Wollenberger¹

¹ Analytische Biochemie, Universität Potsdam, Karl-Liebknecht-Str. 24-25; D-14476 Golm

² Analytical Chemistry, Lund University, Sweden

³ BST BiosensorTechnologie GmbH, Berlin

Registriernummer der Online- Anmeldung:158

Vortrag

Alkylphenoethoxylate werden als Bestandteile von Waschmitteln und als Weichmacher eingesetzt und gelangen so in großer Zahl ins Abwasser. Alkylphenole, als relativ hydrophobe Abbauprodukte, gelten aufgrund ihres hohen östrogenen Potential als Umwelthormone (endocrine disruptors). Deshalb werden verschiedene klassische und biochemische Analysenmethoden für die Substanzklasse entwickelt. Das hohe Probenaufkommen verlangt nach schnellen Nachweisverfahren, die mit Hilfe von automatisierbaren Fließ-Systemen realisiert werden kann.

In dieser Arbeit präsentieren wir einen elektrochemischen Fließ-Immunoassay (EFIA), der eine Kombination eines empfindlichen Biosensors mit einem Kapillar-Immuno-Reaktor darstellt.

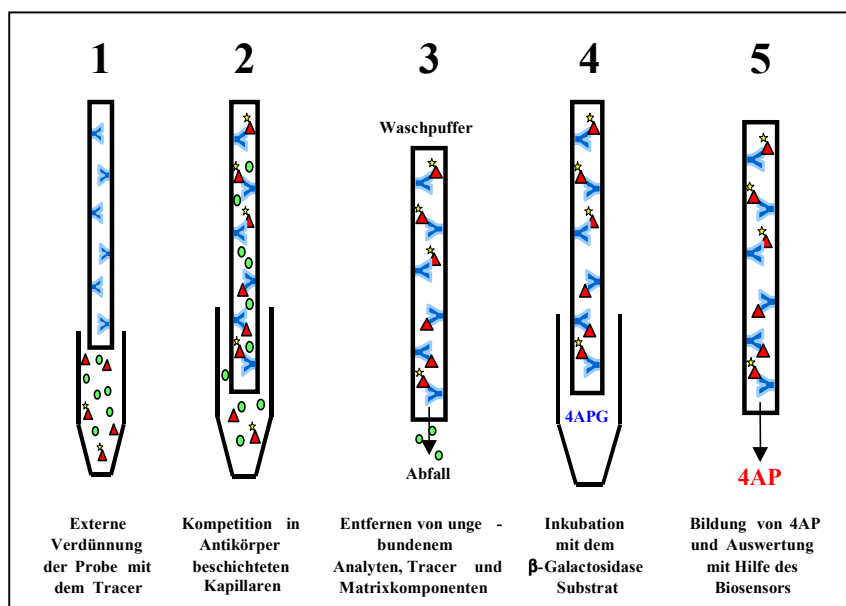


Abb. 1: Schema des off-line Kapillar-Immuno-Assay

Im vorgestellten Ansatz werden Antikörper gegen die Zielsubstanzen Nonyl-, Oktylphenol, und Nonylphenoethoxylat in Mikro-Kapillaren immobilisiert, in denen Konkurrenz stattfindet (Abb. 1). Dazu wird die Probenlösung mit Tracer versetzt und gemeinsam in den Kapillaren inkubiert. Nach einem anschließenden Spülschritt wird die gebundene Menge markierter Analyt quantifiziert, indem das aminophenolierte Substrat des Tracers injiziert wird. Nach zeitlich kontrollierter Hydrolyse wird das gebildete p-Aminophenol am Biosensor vorbei geführt und dabei vermessen.

Als Markierungssubstanz für den Tracer wird β -D-Galactosidase verwendet, welche Amino- und Nitrophenylgalactopyranosid hydrolysiert und so Amino- bzw. Nitrophenol freisetzt. Die Tracer werden durch chemische Kopplung der zur Immunisierung verwendeten Haptene mit dem Enzym (β Gal) dargestellt.

Die Charakterisierung der synthetisierten Tracer erfolgt durch photometrische Aktivitäts-Messungen nach der hydrolytischen Freisetzung von p-Nitrophenol (pNP) aus p-Nitrophenyl-Galactosid (pNPG) bei 405 nm. Mit Hilfe eines Biosensors kann die Enzymaktivität jedoch direkt elektrochemisch, über die Detektion von gebildetem p-Aminophenol (pAP) pro Zeiteinheit bestimmt werden.

Für diese elektrochemischen Messungen wurde ein Biosensor entwickelt, der eine PQQ-abhängige Glucosedehydrogenase enthält. Dazu wurde das Enzym in einer Polymermatrix eingebettet und auf Dickschichtelektroden immobilisiert. Dieser Biosensor, der bereits für den Nachweis von phenolischen Inhaltsstoffen in der Abwasseranalytik eingesetzt wurde, zeichnet sich durch hohe Empfindlichkeit gegenüber p-Aminophenol aus. Glucose Dehydrogenase ermöglicht die zyklische Regenerierung des elektrochemisch aktiven Aminophenols und dadurch eine Verstärkung des Elektrodensignals und deshalb Detektionsgrenzen im unteren nanomolaren Bereich.

Der Einsatz des GDH Biosensors als Labeldetektor im Immuno-Fließ-System ermöglicht die Quantifizierung des entstehenden p-Aminophenols und somit indirekt die Messung der Tracerkonzentration. Bei gegebener Menge von immobilisierten Antikörpern wird eine festgelegte Menge Tracer mit unbekannter Menge Analyt vermischt. Je mehr Analyt vorhanden ist, desto weniger Tracer kann von den Antikörpern gebunden werden, so daß es zu einer Verringerung des Ausgangssignals kommt (Abb. 3).

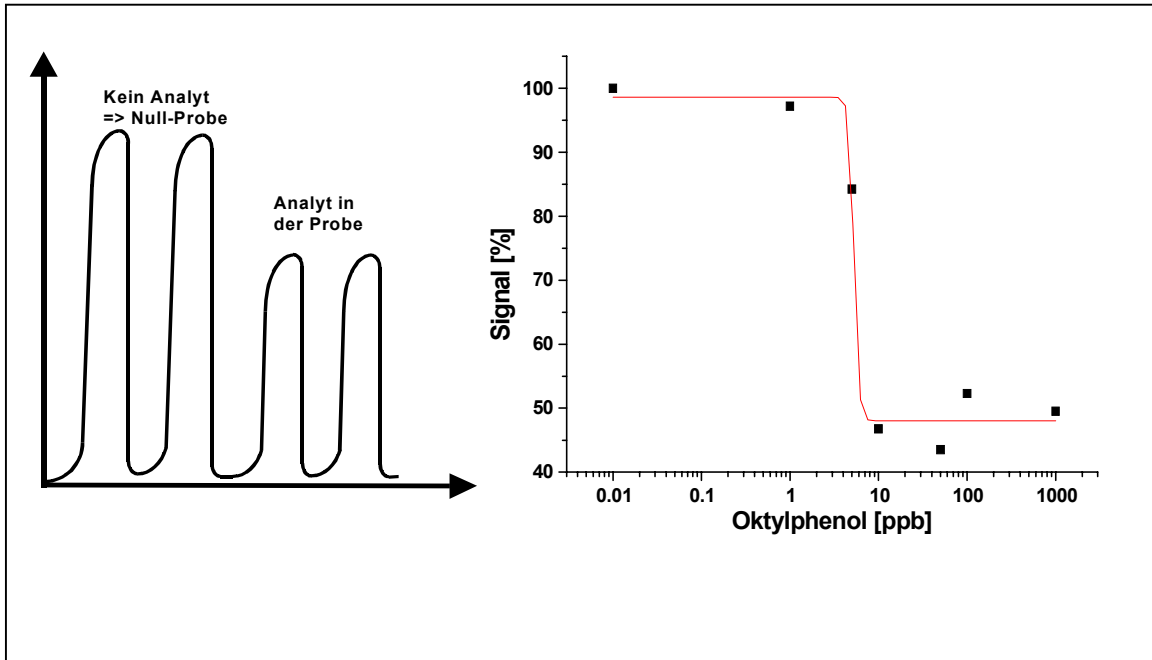


Abb. 2: Analytverdünnungskurve für einen kompetitiven Kapillarimmunoassay zur Bestimmung von Oktylphenol

Oktylphenol kann mit Hilfe dieser Methode im ppb-Bereich detektiert werden. Detaillierte Darstellungen der Analysenmethode, sowie weitere Optimierungen werden Inhalt der Präsentation sein.

Finanzielle Unterstützung der Arbeiten durch die Europäischen Union (INExSPORT, Sensepole) wird dankend gewürdigt.