

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Sensorische Anwendungen der kalorimetrischen Detektion mit enzymatischer Erkennung

Dr. Regina Hüttl, Dr. Johannes Lerchner, DC Hagen Graebner, DC Antje Wolf, Prof. Dr. Gert Wolf

Institut für Physikalische Chemie, D-09596 Freiberg

Tel. 03731/393429

huettl@erg.phych.tu-freiberg.de

Registriernummer der Online-Anmeldung: 161

Poster

Am Institut für Physikalische Chemie der TU Bergakademie Freiberg wurden auf der Grundlage integrierter Schaltkreise im batch-mode und flow-mode arbeitende Wärmeflusskalorimeter (IC-Kalorimeter) entwickelt. Der Miniaturisierungsgrad dieser kalorimetrischen Systeme erlaubt verschiedenste Sensoranwendungen. Der vorliegende Beitrag soll die Möglichkeiten der Kombination des universell anwendbaren kalorimetrischen Messprinzips mit der hohen Spezifität der enzymatischen Katalyse zeigen. So können kalorimetrische Untersuchungen enzymatisch katalysierter Reaktionen unter analytischen Gesichtspunkten wie der Konzentrationsbestimmung von Substraten für die klinische Diagnostik oder die Überwachung biotechnologischer Prozesse eingesetzt werden. Andererseits wird die Ermittlung kinetischer Parameter aus kalorimetrischen Messkurven mit dem Ziel der Bestimmung von Enzymaktivitäten und zur Quantifizierung von Inhibitoren verfolgt.

IC-Kalorimeter im batch-mode

Das Batch-Wärmeflusskalorimeter [1] arbeitet mit Probenvolumina von 7 μ l und zeichnet sich durch eine sehr kleine Zeitkonstante von 4s für kinetische Untersuchungen aus. Das Enzym kann sowohl in löslicher als auch in immobilisierter Form eingesetzt werden. Folgende Untersuchungen wurden mit dieser Anordnung vorgenommen:

- Konzentrationsbestimmung von Substraten über eine definierte enzymatisch katalysierte Umsetzung
- Ermittlung katalytischer Aktivitäten von Enzymlösungen und Enzym-Träger-Komplexen
- Bestimmung von Inhibitorkonzentrationen

Als analytisch interessante Problemstellungen wurden unter anderem Glucose- und Phenolkonzentrationen mit diesem IC-Kalorimeter ermittelt (s. Abb. 1).

Die Immobilisierung von Enzymen auf verschiedenste Trägermaterialien ist in der Regel mit einer Veränderung der Aktivität gegenüber dem nativen Enzym verbunden. Insbesondere für die Entwicklung von Biosensoren ist die Bestimmung der Aktivität dieser Enzym-Träger-Komplexe von großer Bedeutung. Vordergründig sollten dabei flächige Immobilisate eingesetzt werden, die eine flexible Anordnung zur schnellen Umstellung auf verschiedene Messaufgaben gestatten. Beispielhaft werden als Trägermaterialien mesoporöse Glasmembranen der Arbeitsgruppe von Prof. Janowski (Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg) [2] vorgestellt. Als Enzym-Substrat-System diente die Wasserstoffperoxidzerlegung durch das Enzym Katalase.

Die Quantifizierung von Inhibitoreffekten aus der Messung der Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration wird am Beispiel des Cyanidnachweises (ppb-Bereich) über die Peroxidasehemmung gezeigt (Abb.2).

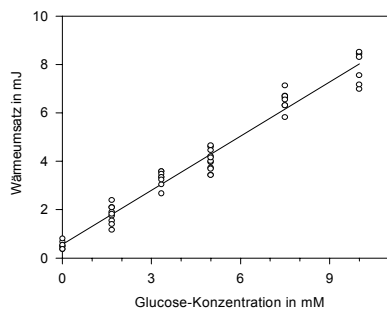


Abb 1: Wärmeumsatz in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration

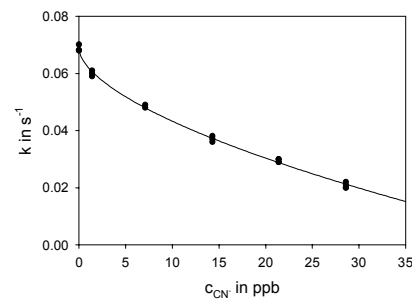


Abb2: Geschwindigkeitskonstante in Abhängigkeit von der Cyanidkonzentration

IC-Kalorimeter im flow-mode

Durchflusskalorimeter können in Kombination mit enzymatischen Erkennungsreaktionen zur Analyse von Multisubstratlösungen verwendet werden. Dazu wird der Substratstrom sequentiell mit geeigneten Enzymen kontaktiert und die bei jeder chemischen Reaktion auftretende Wärmeleistung als konzentrationsabhängiges Signal registriert [3]. Wesentliche Voraussetzung für eine praktikable Anwendung dieses Prinzips ist die Verfügbarkeit ausreichend miniaturisierter kalorimetrischer Durchflusssensoren. Im vorliegenden Beitrag werden Anordnungen auf der Basis thermoelektrischer Transducer vorgestellt. Als Modellsystem aus der klinischen Diagnostik wird die Untersuchung eines Gemisches aus Penicillin, Harnstoff und Glucose vorgestellt (Abb. 3).

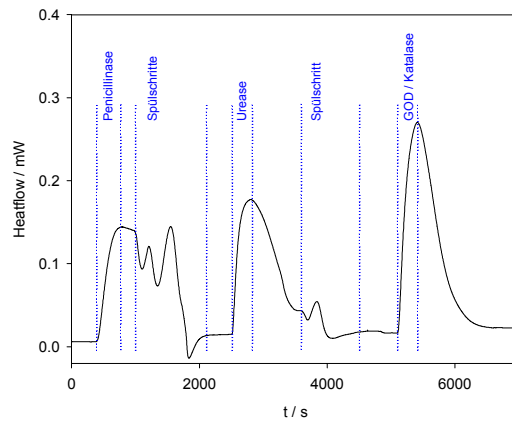


Abb. 3: 1 mmol/l (Penicillin G + Glucose + Harnstoff) in 0,1 mol/l Phosphatpuffer

Literatur

- [1] Lerchner, J.; Oehmgen, R.; Wolf, G.; Le Parlour, P.; Daudon, J.-L. High Temperatures - High Pressures, (1998), **30**, S.701-708.
- [2] Otto, K. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1999
- [3] Wolf, A.; Weber, A.; Hüttl, R.; Lerchner J. and Wolf, G., Thermochim. Acta, (1999), **337**, 27-28