

Blutanalytik und Biosensorik mit Schwingquarzen

Reiner Krapf¹, Christof Weinstock², Hinnak Northoff², Christiane Ziegler¹

¹ Uni Kaiserslautern, Institut für Technische Physik, Erwin Schrödingerstr. 56, D-67663 Kaiserslautern

² Uniklinik Tübingen, Transfusionsmedizin mit Blutbank, Otfried-Müller-Str. 4/1, D-72076 Tübingen

reiner.krapf@ipc.uni-tuebingen.de www.physik.uni-kl.de/ziegler/ www.ipc.uni-tuebingen.de

Registriernummer der Online-Anmeldung: 110

Poster

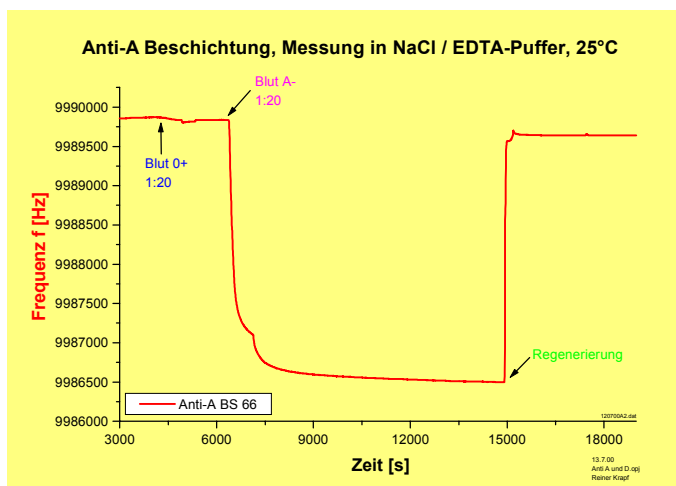
Die Blutanalyse, insbesondere die Blutgruppenbestimmung sowie Blutantikörperbestimmung ist ein wichtiger Vorgang in der klinischen Diagnostik. Ziel eines automatisierten Verfahrens zur Blutgruppenbestimmung ist daher eine sichere, schnelle und kostengünstige Methode; diese Vorgaben lassen sich mit einem entsprechend modifizierten, regenerierbaren Biosensor realisieren:

Schwingquarze (QCM, quartz crystal microbalance, Quarzmikrowaage) sind als massensensitive Sensoren überall dort verwendbar, wo die Detektion des Analyten mit einer Massenänderung auf der Oberfläche des Quarzes verbunden ist. Dies ist z.B. im gesamten Gebiet der Immunreaktionen der Fall, wo Antigene mit entsprechenden Antikörpern reagieren können und somit an Masse zunehmen. Der Ansatzpunkt des hier beschriebenen Verfahrens stützt sich auf einen modifizierten Schwingquarz, auf dessen Oberfläche ein Blutgruppenantikörper immobilisiert ist. Gekoppelt ist dieser Schwingquarz mit einer FIA (Fliess-Injektions-Anlage), sodass Messungen in einem kontinuierlichen Puffer- und Analytfluss möglich sind.

Die auf den Erythrozyten vorhandenen Epitope können mit entsprechenden Antikörpern spezifisch reagieren. Ein mit Anti-A belegter Quarz sollte also in der Lage sein, Erythrozyten einzufangen, indem

sie an das F_{ab} Fragment des Antikörpers binden. Der Quarz mit aufgedampfter Goldelektrode wird durch einen Schwingkreis zum Schwingen angeregt, wobei die aktuelle Schwingungsfrequenz gemessen wird; die verwendeten Quarze schwingen im 10MHz-Bereich.

Eine Bestimmung der Blutgruppe im AB0-System ist problemlos möglich (siehe Messkurve). Die Bestimmung des

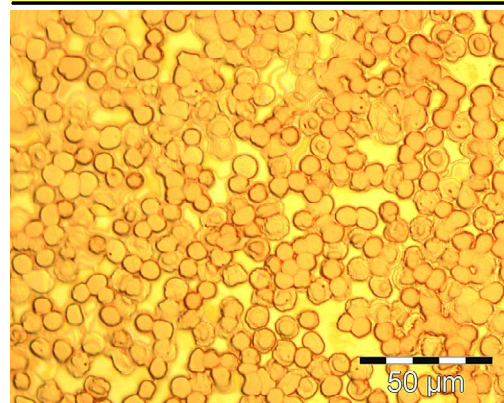
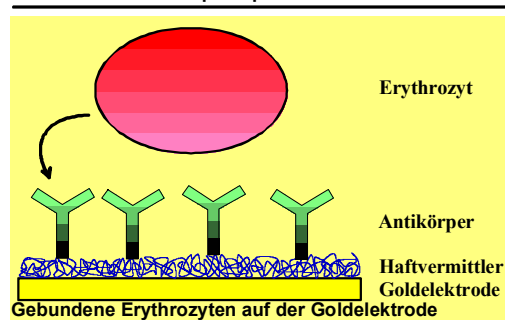


Rhesusfaktors funktioniert entweder ganz einfach mit einer IgG-Beschichtung, wobei die Erythrozyten hier mit Bromelin vorbehandelt werden können, was bei vielen in der Blutanalytik angewendeten Methoden sowieso gemacht wird. Der Rhesusfaktor unbehandelter Erythrozyten kann mit leichten Signaleinbußen ebenfalls sicher über die obige Standard-beschichtung oder mit einer speziellen IgM-Beschichtung bestimmt werden.

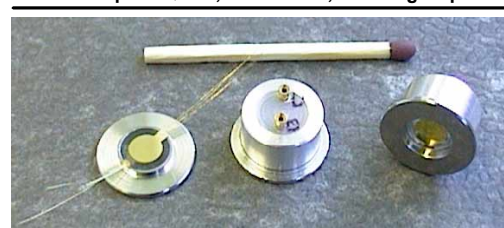
Durch die gelungene Regenerierung des Quarzes kann man diesen immer neu verwenden, wenn man ihn vor jeder Messung mit frischem Antikörper belegt. Eine optimierte Fließ-Injektionsanlage wurde mit Teflonschläuchen realisiert, wobei die Ventile und Quarze von einer selbstgeschriebenen Software angesteuert werden.

Entscheidend für eine sichere Bestimmung der Blutgruppen und v.a. des Rhesusfaktors ist eine optimierte Immobilisierung des Antikörpers. Durch die Berücksichtigung der relevanten Parameter (Konzentration der Lösungen, Belegungstemperatur, Immobilisierungszeit, Puffer, pH-Wert) wurde eine optimale Immobilisierungsvorschrift erarbeitet, die unspezifische Wechselwirkungen minimiert bzw. bei der Hauptblutgruppenbestimmung (AB0) ganz eliminiert. Es handelt sich dabei um eine Ankopplung von Protein A auf die Goldoberfläche des Quarzes, worauf sich direkt IgG-Antikörper anlagern können (6 verschiedene Antikörper wurden getestet). Darüber hinaus wurden Beschichtungen für IgM-Antikörper und Doppel-IgG-Antikörper (Spacer) entwickelt.

Schematisches Messprinzip



Goldbedampfer Quarz, links: offen, rechts: gekapselt



Des Weiteren wurde die Regeneration der Quarze nach einer Messung verfeinert (Ablösung der Erythrozyten und des Antikörpers), wobei 7 Regenerationszyklen möglich waren, bevor wieder neu mit Protein A belegt werden musste. Die Belegung kann entweder extern (batch, 30µl) oder im Fluss (150µl) durchgeführt werden, sodass der Quarz nicht ausgebaut werden muss; die verwendeten Antikörperlösungen bzw. Protein-A-Lösungen sind mehrfach verwendbar.

Die Sensitivität der Methode wurde so weit gesteigert, dass für eine Blutgruppenbestimmung weniger als 50 nl Blut nötig sind.

Durch die universelle Beschichtungstechnik können alle immunologisch relevanten Probleme angegangen werden, zu denen Antikörper verfügbar sind; weiterhin ist die Quarztechnik kostengünstig und eine Miniaturisierung bis hin zum Handgerät möglich.

Literatur

- [1] Tessier, L.; Schmitt, N.; Watier, H.; Brumas, V.; Patat, F. (1997) *Analytica Chimica Acta* **347**, 207-217.
- [2] Kaspar, M. (2000), *Dissertation*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen,
<http://w210.ub.uni-tuebingen.de/dbt/volltexte/2000/197>