

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

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

Immunosensor zur Multi-Analyt-Detektion von endokrin wirksamen Substanzen im Abwasser

Dipl. chem. Sabine Reder

Institut für Theoretische und Physikalische Chemie, Auf der Morgenstelle 8, D-72076 Tübingen

Tel. 07071-29 74667

sabine.reder@ipc.uni-tuebingen.de www.barolo.ipc.uni-tuebingen.de

Registriernummer der Online-Anmeldung: 208

Poster

Anthropogene Stoffe in hohen Konzentrationen stellen eine große Umweltbelastung dar. Besondere gehen hierbei von endokrin wirksamen Umweltchemikalien aus, da sie negative Auswirkungen auf die Reproduktionsbiologie von Tieren haben^[1]. Diese Klasse der hormonähnlichen Substanzen, zu denen z. B. Bisphenol A, Nonylphenol und o,p'-DDT zählen, ist strukturell sehr heterogen. Weiterhin finden sich in unseren Gewässern aber auch natürliche und synthetische Estrogene wie z. B. 17 β -Estradiol und 17 α -Ethinylestradiol, letzteres findet in Kontrazeptiva Verwendung. Aufgrund der im Vergleich mit den Xenoestrogenen um ein Vielfaches höheren estrogenen Wirkung dieser Substanzen, sind diese ebenfalls zu berücksichtigen^[2].

Hier soll ein Nachweissystem zur quantitativen und simultanen Bestimmung von Estrogenen im Abwasser dargestellt werden.

Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern als Sonden lassen sich die entsprechenden Analyten in einer spezifischen Affinitätsreaktion detektieren. Das Assayformat ist ein Bindungshemmtest: Eine Probe mit Analyt wird mit einem oder mehreren Antikörpern versetzt. Die Mischung wird mittels einer sequentiellen Fluidik zum Detektionssystem transferiert, wo die nicht inhibierten Antikörper spezifisch an die modifizierte Oberfläche des Meßwertumwandlers binden. Die Fluoreszenz korreliert gegenläufig zur Konzentration des Analyten.

Den Meßwertumwandler bildet ein Glasträger (15 x 60 mm), in den Laserlicht (635 nm) über eine angeschrägte Stirnfläche eingekoppelt und durch Totalreflexion weitergeleitet wird. An den Reflexionspunkten wird im Umgebungsmedium ein evaneszentes Feld erzeugt, das zur Anregung oberflächennaher, fluoreszierender Moleküle genutzt werden kann. Das Fluoreszenzlicht wird von Polymerfasern auf der Rückseite des Glasträgers zu den Photodioden weitergeleitet. Mit Hilfe von Filtern und Lock-In-Technik wird das Rauschen verringert. An sechs Reflexionspunkten im Abstand von 6,5 mm entsteht durch orts aufgelöste, kovalente Immobilisierung von Analytderivaten mit

Mikrodosiersystem eine Oberfläche, an der Antikörper an definierten Stellen spezifisch binden. Nach jeder Messung wird die Oberfläche regeneriert.

Die Quantifizierung erfolgt über Kalibrierung der einzelnen Analyten. In Bild 1 sind die Kalibrierkurven für 17- β -Estradiol, 17- α -Ethinylestradiol, Estron und Bisphenol A dargestellt.

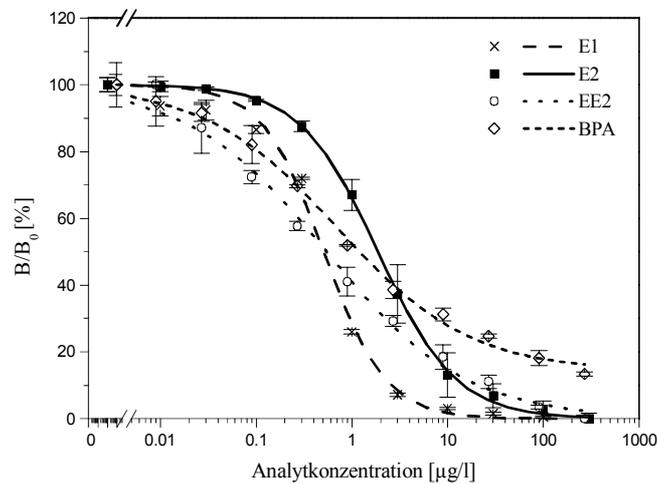


Bild 1: Einzel-Analyt-Kalibrierkurven von 17- β -Estradiol, 17- α -Ethinylestradiol, Estron und Bisphenol A mit dem jeweilig spezifischen Antikörper

Mit diesem Gerät ist eine Messung direkt im Abwasser möglich, ohne Vorbehandlung oder Konzentrierung der Analyte. In Tabelle 1 sind Wiederfindungsraten von Analyten in synthetischem Abwasser gezeigt.

Analyt	wahre Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Signal [%]	gemess. Konz. [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindungsrate [%]
17- β -Estradiol	0.5	82.96	0.47 \pm 0.04	94.74
	1	74.89	0.75 \pm 0.01	74.99
	2	60.70	1.41 \pm 0.09	70.33
Estron	0.5	62.46	0.35 \pm 0.09	70.69
	1	29.88	0.96 \pm 0.02	96.40
	2	15.35	1.84 \pm 0.04	91.80
17- α -Ethinylestradiol	0.5	54.77	0.70 \pm 0.07	140.57
	1	49.96	1.02 \pm 0.28	102.06
	2	43.04	1.80 \pm 0.26	89.86
Bisphenol A	0.5	59.37	0.66 \pm 0.40	132.85
	1	51.33	1.21 \pm 0.75	121.06
	2	48.35	1.52 \pm 0.98	76.07

Tabelle 1: Wiederfindungsraten von Messung in synthetischem Abwasser

Außerdem wird eine Kalibrierung von 17- β -Estradiol und 17- α -Ethinylestradiol unter der Verwendung kreuzreaktiver Antikörper vorgestellt, deren Auswertung über neuronale Netze erfolgt.

Literatur

- [1] Sonnenschein, C. Soto, A. M. (1998) *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **65**, 143-150.
- [2] Kavlock, R. J. Daston, G.P. DeRosa, C. Fenner-Crisp, P. Gray, L. E. Kaattari, S. Lucier, G. Luster, M. Mac, M. J. Maczka, C. Miller, R. Moore, J. Rolland, R. Scott, G. Sheehan, D. M. Sinks, T. Tilson, H. A. (1996) *Environ Health Perspect.* **104**, **4**, 715-740.
- [3] Brecht, A. Klotz, A. Barzen, C. Gauglitz, G. Harris, R. D. Quigley, G. R. Wilkinson, J. S. Sztajn bok, P. Abuknesha, R. Gascón, J. Oubiña, A. Barceló, D. (1998) *Anal. Chim. Acta.* **362**, 69-79.
- [4] Klotz, A. Brecht, A. Barzen, C. Gauglitz, G. Harris, R. D. Quigley, G. R. Wilkinson, J. S. Abuknesha, R. (1998) *Sens. and Actuators B.* **51**, 181-187.