



# Immunsensor zur Multi-Analyt-Detektion von endokrin wirksamen Substanzen im Abwasser



S. Reder<sup>1</sup>, F. Dieterle<sup>1</sup>, C. Barzen<sup>1</sup>, I. Coille<sup>1</sup>, R. Abuknesha<sup>2</sup>, G. Gauglitz<sup>1</sup>

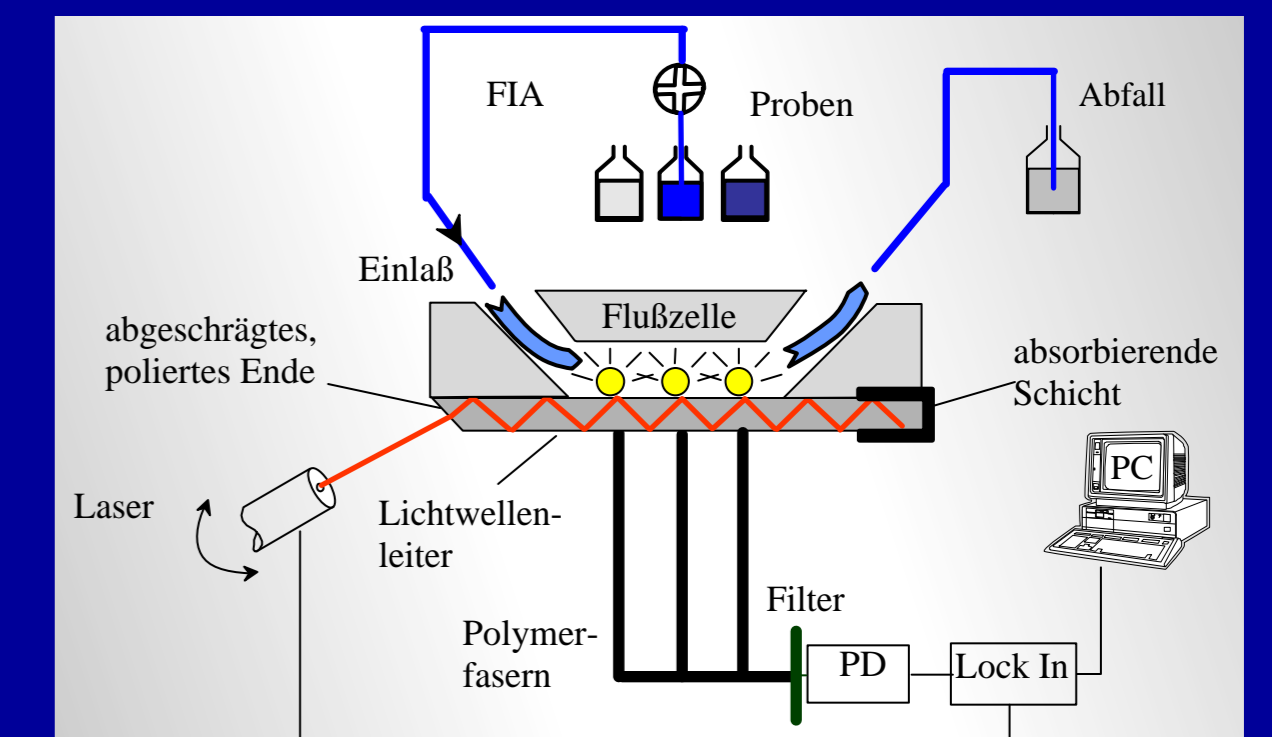
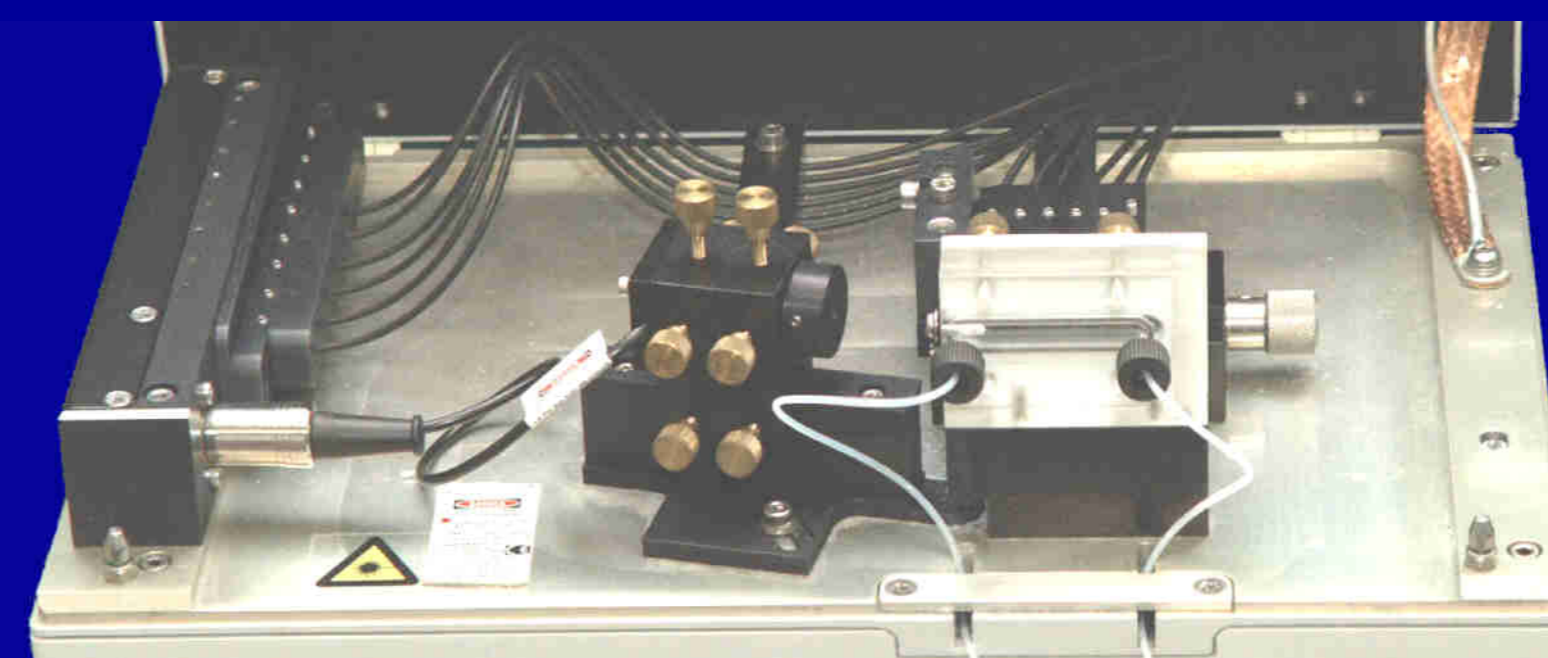
<sup>1</sup> Institut für Physikalische Chemie, University of Tuebingen, 72076 Tübingen, FRG  
<sup>2</sup> Division of Life Sciences, King's College London, London W8 7 AH, GB

## Einleitung

- In den letzten Jahren wurden immer mehr Substanzen gefunden, die estrogene Wirkung zeigen. Diese Xenoestrogene, wie z.B. Bisphenol A (in Plastikflaschen), Nonylphenol (Detergenz) und DDT, imitieren oder hemmen die Wirkung der natürlichen Estrogene, wie z.B. Estradiol. Die Kontamination mit Umweltestrogenen im Wasser zeigt Auswirkungen auf die Tierwelt, insbesondere bei Fischen findet man eine Verweiblichung, die auch im Experiment nachgewiesen werden konnten. Die Auswirkungen auf den Menschen sind weitgehend unbekannt und stark umstritten.
- Hier wurde ein Biosensor entwickelt, mit dem sich Wasserproben ohne Vorbehandlung oder Konzentrierung direkt analysieren lassen. Die zu erwartenden Konzentrationen für Estradiol, Estron, Ethinylestradiol und Bisphenol A liegen im ppt bis ppb Bereich. Das heißt, der Sensor muß extrem sensitiv sein. Außerdem sollen damit schwierige Matrices, wie z.B. Abwasserproben untersucht werden.
- Weitere, erreichte Ansprüche an den Biosensor sind:
  - schnelle Analysenzeit
  - geringe Kosten
  - kleines Gerät für Vorortmessungen (momentane Größe: 30 x 30 x 50 cm)
  - Möglichkeit für kontinuierliche Messung vor Ort

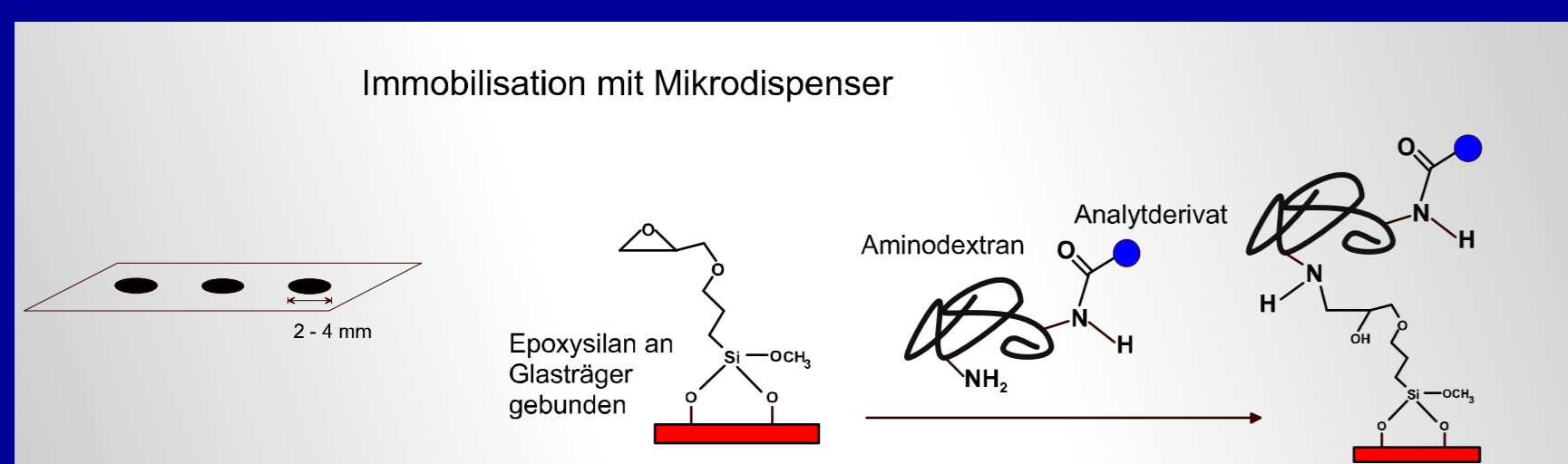
## Detektionsprinzip: TIRF

Die Detektionseinheit arbeitet mit dem TIRF-Prinzip ("Total Internal Reflection Fluorescence"). Dazu wird das Licht einer Laserdiode (635 nm) in einen angeschrägten Glasträger eingekoppelt und durch Totalreflexion weitergeleitet. An den Reflexionspunkten entsteht im umgebenden Medium ein evaneszentes Feld. In diesem werden oberflächennahe fluoreszenzmarkierte Moleküle angeregt. Das Fluoreszenzlicht wird über Polymerfasern auf der Rückseite des Glasträgers zu den Photodioden gebracht. Mit Hilfe von Filtern und Lock-In Technik wird das Rauschen minimiert.



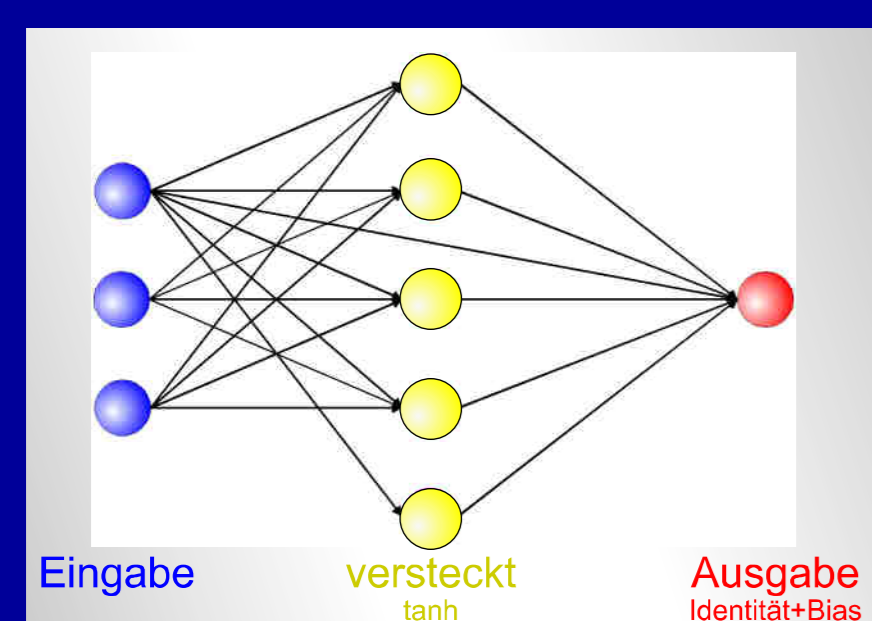
## Oberflächen

Zur Vermeidung von unspezifischer Bindung auf der Oberfläche wird diese mit einem kovalent immobilisierten Dextran geschützt. Die Analyt-derivate werden für die Einzelanalytmessungen auf der gesamten Oberfläche des Glasträgers immobilisiert. Für die multivariaten Messungen wird ein Dextran-Derivat-Konjugat mit Hilfe einer Piezopipette auf die Oberfläche getropft (Spotdurchmesser: 3mm).

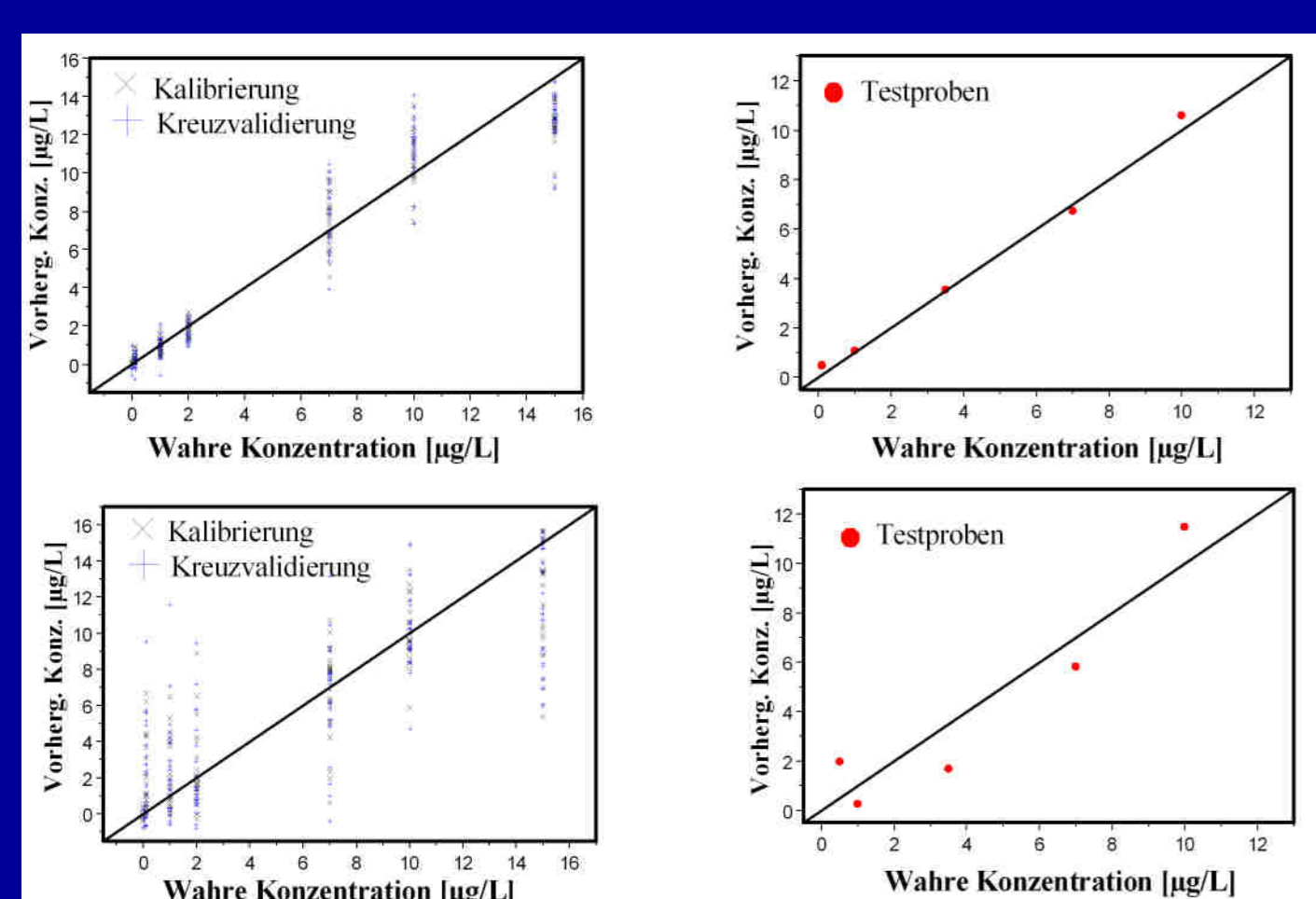


## Multianalyt-Nachweis

- gleichzeitiger Nachweis von zwei Analyten (Estradiol, Ethinylestradiol) mit zwei kreuzreaktiven Antikörpern auf drei unterschiedlich modifizierten Spots
- In den Signalen von jedem Spot ist die Information beider Analyte enthalten, deshalb erfolgt die Auswertung mit neuronalen Netzen:



- Für jeden Analyten ein Netz
- Anwendung eines Pruning-Verfahrens während des Trainings
- Überprüfung der Netze mit unabhängigen Testdatensatz



Netz zur Vorhersage von Estradiol mit Kalibrierkurve, Kreuzvalidierung und unabhängigen Testproben

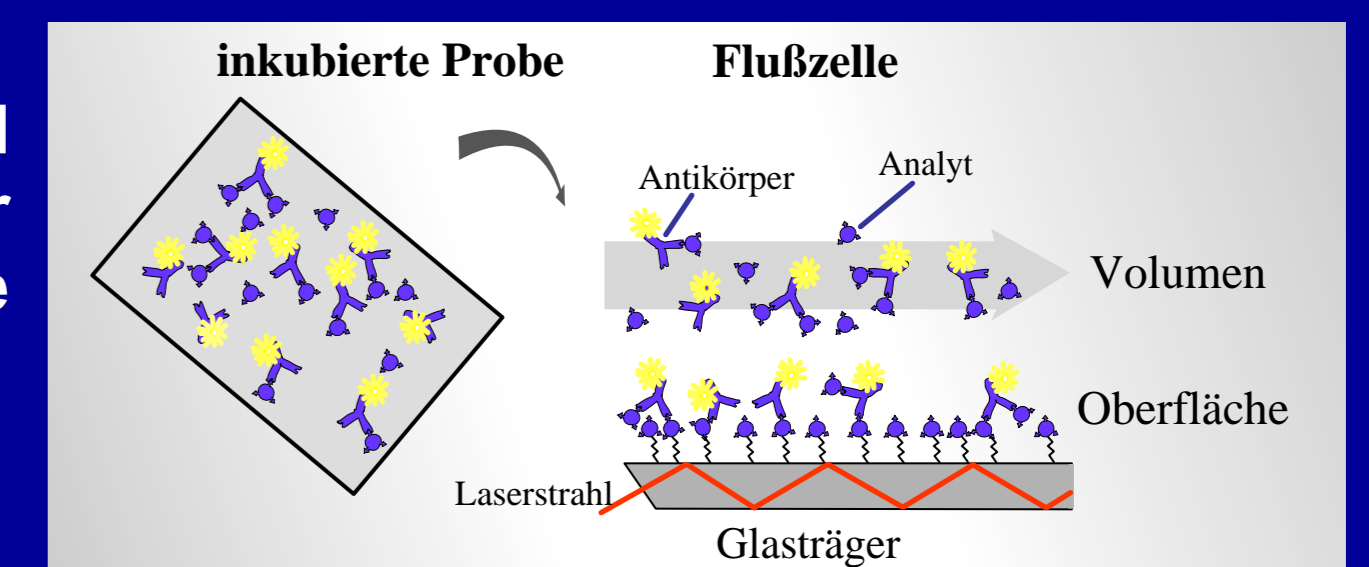
Netz zur Vorhersage von Ethinylestradiol mit Kalibrierkurve, Kreuzvalidierung und unabhängigen Testproben

- Gute Vorhersage der Estradiolkonzentration in den Testproben, für Ethinylestradiol noch zu große Schwankungen.
- Durch Erweiterung des Datensatzes sollte eine bessere Vorhersage möglich sein.

## Bindungshemmtest

Die Probe wird mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern vorinkubiert und dann über die Flusszelle transportiert. Während die Probe kontinuierlich über den Glasträger fließt, diffundieren die Moleküle an die Oberfläche. Nur die nicht blockierten Antikörper binden spezifisch an die Oberfläche.

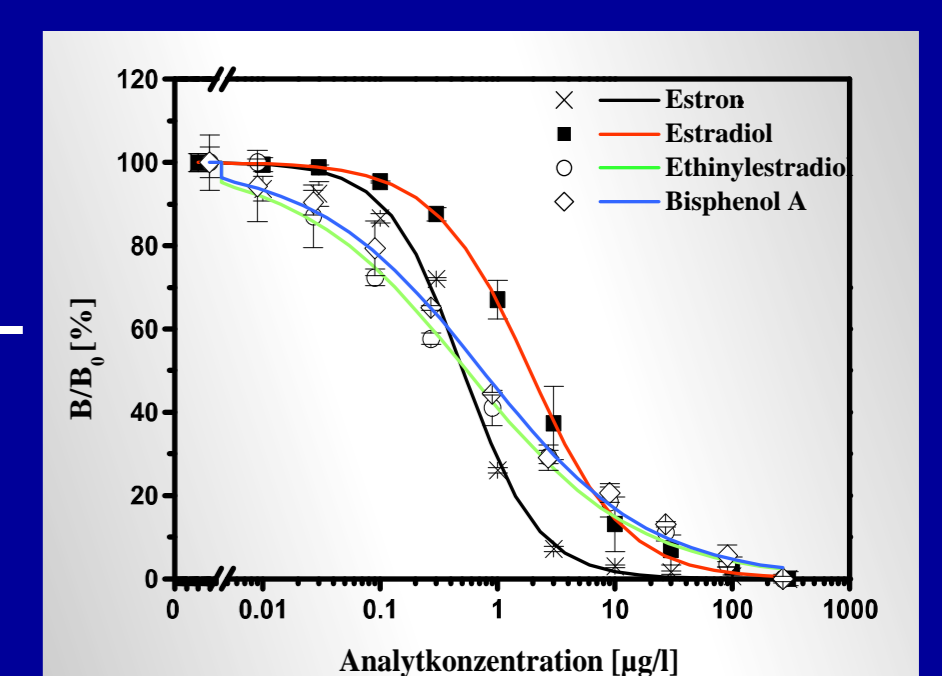
Über das evaneszente Feld findet eine Anregung der oberflächennahen Farbstoffe statt.



## Einzelanalyt-Nachweis

### Kalibrierkurve in Puffer

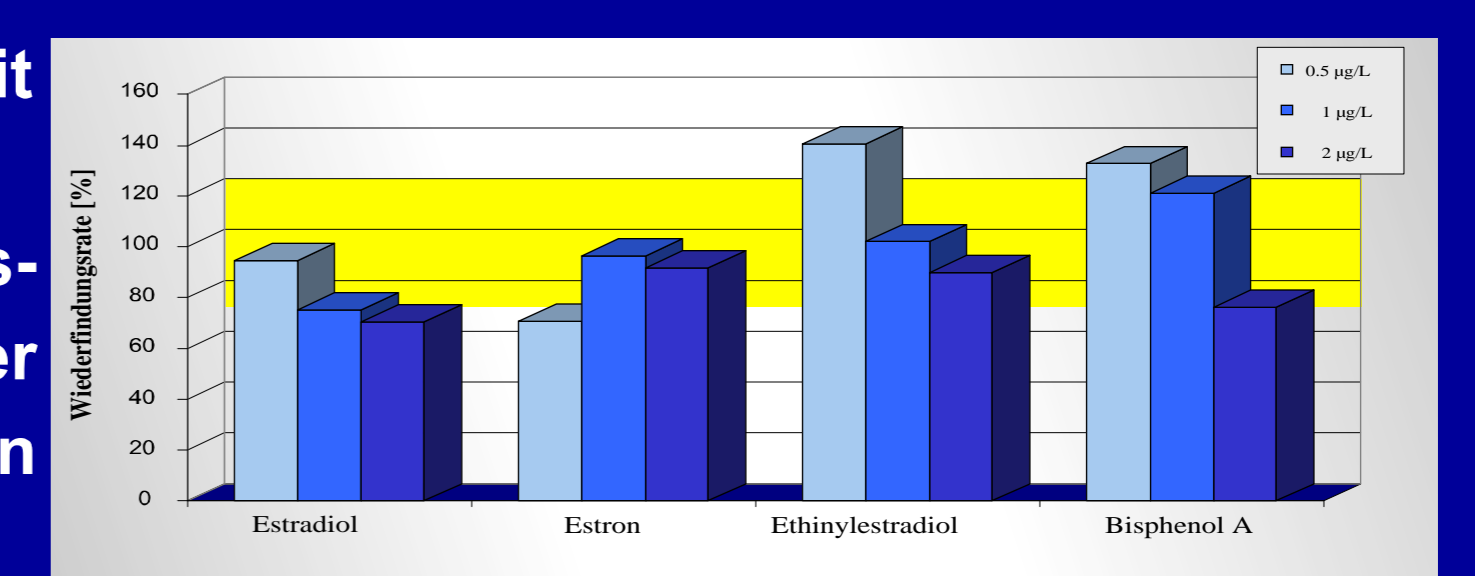
Analyt	AK-Konz [µg/ml]	Nachweisgrenze [µg/l]	Arbeitsbereich [10% - 90%]
Estradiol	0.25	0.16	0.25 - 13.75
Estron	0.25	0.07	0.10 - 2.51
Ethinylestradiol	0.25	0.06	0.02 - 22.14
Bisphenol A	0.25	0.03	0.02 - 23.56



Nachweisgrenzen der Einzelanalytmessungen liegen zwischen 30 und 160 ppt.

### Abwasserproben

Synthetisch hergestelltes Abwasser wird jeweils mit drei verschiedenen Konzentrationen Analyt versetzt. Bis auf zwei Ausreißer liegen die Wiederfindungsraten im Bereich zwischen 70% und 120%, wie von der AOAC gefordert. Die Ausreißer begründen sich in Pipettierfehler.



## Zusammenfassung und Ausblick

- Die Nachweisgrenze der Einzelanalytmessungen liegt im ppt-Bereich.
- Die Wiederfindungsraten liegen im Bereich zwischen 70-140 %.
- Die Auswertung mit neuronalen Netzen ist möglich. Es findet kein Auswendiglernen statt.
- Die Vorhersage von Estradiol im Gemisch ist hervorragend. Die von Ethinylestradiol muß durch Ausweitung des Datensatzes noch verbessert werden.
- Der nächste Schritt ist der simultane Nachweis von mehr als zwei Analyten, mit Abwassertestproben. Außerdem soll die Analytpalette erweitert werden und eine weitere Miniaturisierung stattfinden. Dies soll ein unüberwachtes Monitoring von Oberflächengewässern ermöglichen.

### Danksagung

Diese Studie wurde im Rahmen des Umwelt und Klima Programm der EU gefördert (ENV4-CT98-0801). Sabine Reder wird im Rahmen des Graduiertenkollegs Analytische Chemie gefördert.

