

Untersuchungen zur Entwicklung eines enzymatisch-elektrochemischen Histamin-Immunsensors.

Robert Hellmich und Bernd Gründig
SensLab - Gesellschaft zur Entwicklung und
Herstellung bioelektrochemischer Sensoren mbH
Permoserstraße 15, D-04318 Leipzig
Registriernummer der Online-Anmeldung: 106

Poster

Einleitung:

Das biogene Amin Histamin gilt als typischer Verderbnisparameter von Lebensmitteln und Verursacher sogenannter Pseudoallergien, die in zunehmenden Maße in westlichen Industrienationen auftreten. Deshalb besteht in der Lebensmittelherstellung und in der Kontrolle von Lebensmitteln ein wachsender Bedarf an schnellen und kostengünstigen Verfahren zur Quantifizierung von Histamin.

Intensive Entwicklungsaktivitäten zur Immunosensorik sind ein Hinweis darauf, daß Immunsensoren eine analytische Alternative darstellen könnten. Auch unsere Arbeiten zielen auf die Entwicklung eines enzymatisch-elektrochemischen Immunsensors zur quantitativen Bestimmung von Histamin. Hierzu soll einerseits die immunochemische Indikationsreaktion etabliert werden, und andererseits deren amperometrische Detektion. Die Kombination beider Teilarbeiten soll zu einem planaren mittels Dickschichttechnologie herzustellenden Sensors führen, der mittels Handmeßgerät auszulesen ist.

Methoden und Ergebnisse:

Für die Entwicklung eines kompetitiven ELISA wurde auf einen kommerziell verfügbaren monoklonalen Maus-Anti-Histamin-Antikörper der Firma Biotrend, den Avrameas *et al.* beschrieben hat, zurückgegriffen [1]. Als Markerenzym diente β -Galactosidase, an die Histamin mittels *p*-Benzochinon gekoppelt wurde [2].

Dazu sind vier β -Galactosidasen (*E. coli*) verschiedener Hersteller, auf ihre Aktivität unter Verwendung von *p*-Aminophenyl- β -D-galactosid als Substrat, amperometrisch untersucht worden. Zwei β -Galactosidasen wiesen mit $611 \mu\text{A}/\text{mM}/\text{cm}^2$ (Mittelwert) eine um 26 % höhere Sensorempfindlichkeit im Vergleich zu den anderen zwei Enzymen auf.

Nach der Konjugation wurde bei der eingesetzten β -Galactosidase jedoch nur noch 5 % zur ursprünglichen Aktivität festgestellt. Eine Ursache dessen kann darin liegen, daß bei der Behandlung mit *p*-Benzochinon SH-Gruppen von Aminosäuren in die Reaktion einbezogen werden, die nach Untersuchungen von Wallenfels *et al.* [3] in der β -Galactosidase eine wichtige Rolle bei der Bildung der aktiven Konformation spielen.

Ergänzende Untersuchungen mit der SDS-Gelelektrophorese ergaben, daß neben der zu erwartenden Band von 116 kDa für die β -Galactosidase-Untereinheit eine weitere Bande bei 185 kDa auftrat, die eine Quervernetzung der Untereinheiten vermuten läßt.

Mit diesem Konjugat wurde einen kompetitiven ELISA auf der Basis von Mikrotiterplatten entwickelt. Das aus der Hydrolysereaktion von *o*-Nitrophenyl- β -D-galactosid resultierende Reaktionsprodukt *o*-Nitrophenol wurde nach 20 Minuten Reaktion bei einer Wellenlänge von 405 nm quantifiziert.

Die Nachweisgrenze für *p*-Benzochinon-gekoppeltes Histamin betrug 30 μ g/L. Der lineare Meßbereich lag zwischen 70 μ g/L und 700 μ g/L Histamin-Benzochinon-Konjugat (Abb. 1)

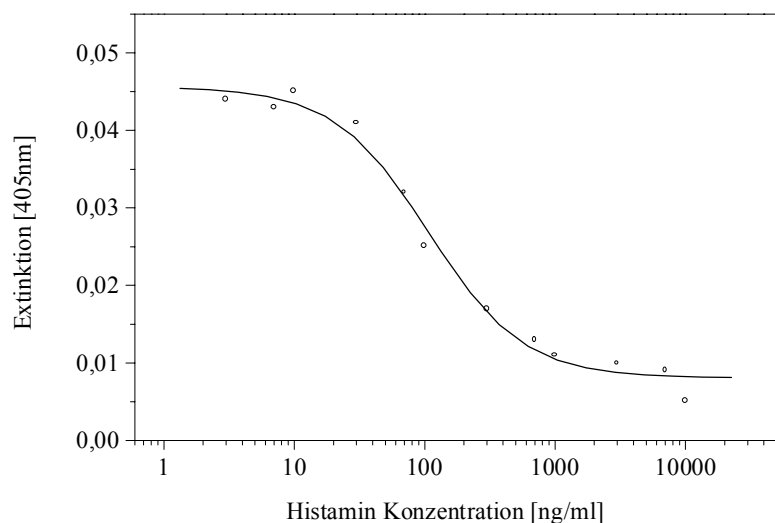


Abbildung 1 Kalibrationskurve für die Bestimmung von Histamin mittels kompetitiven Enzym-Immunoassays

Zur Übertragung des ELISA auf das Sensorprinzip wurden zunächst vergleichende Untersuchungen zur adsorptiven und gerichteten Immobilisierung des monoklonalen Histamin-Antikörpers an verschiedene Membranenmatrices durchgeführt. Die gerichtete Immobilisierung erfolgte über die kovalente Verknüpfung von Hydroxylgruppen der Trägermatrix via Bernsteinsäuredihydrazid an den F_c -Teil der Antikörper nach Perjodatbehandlung [4]. Als günstig hat sich ein, vom Hersteller modifiziertes, Polyamid erwiesen. Diese mit Antikörper immobilisierte Membran wurde direkt auf die

planare Fläche eines Sensormeßfensters, das eine Drei-Elektrodenanordnung aufwies, fixiert. Die Polarisationsspannung an der Kohlenstoffarbeits Elektrode betrug 200 mV. Der Ablauf der immunochemischen Reaktion erfolgte durch das Auftragen einer mit Histamin- β -Galactosidase-Konjugat versetzten Histaminprobe mit einer Inkubation über 15 Minuten und anschließenden Waschschrift. Das in kompetitiver Reaktion gebundene Konjugat wurde dann durch Zugabe von *p*-Aminophenyl- β -D-galactosid über das Reaktionsprodukt *p*-Aminophenol detektiert (Abb. 2).

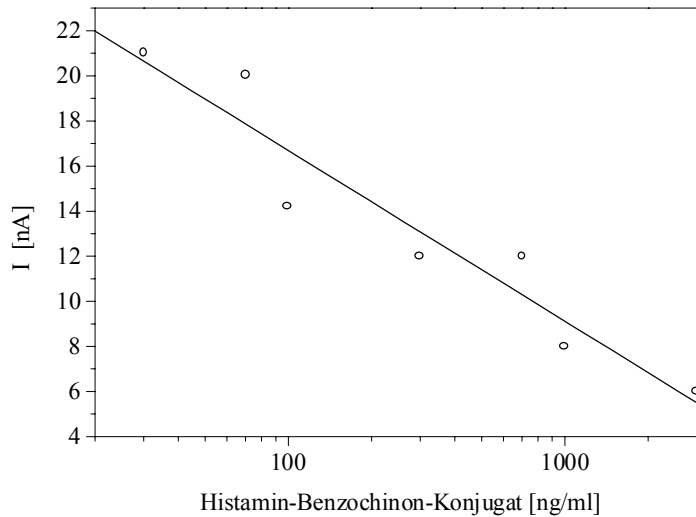


Abbildung 2 Kalibrationskurve für die Bestimmung von Histamin mittels kompetitiven Enzym Immunoassay und amperometrischer Detektion der Enzymreaktion.

In nächsten Schritten wird die immunochemische Reaktionstrecke in Form eines „Jacketaufbaus“ auf den Sensor integriert.

Literatur:

- [1] Avrameas, S., Guesdon, J.-L., Chevrier, D., Mazie, J.-C., David, B.: Monoclonal anti-histamin antibody: Preparation, characterization and application to enzyme immuno-assay of histamine. *Journal of Immunological Methods* 87 (1986), 69-78
- [2] Guesdon, J.-L., Avrameas, S., Chevrier, D., Mazie, J.-C.: Enzyme immunoassay for the measurement of histamine. *Journal of Immunological Methods* 94 (1986), 119-125
- [3] Wallenfels, K., *et al.*: in *The Enzymes* (Boyer *et al.*), Vol. VII (1972), 617-663
- [4] Hermanson, G.-T., Krishna Mallia, A., Smith, P.-K.: *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press London (1992)