

Medizinische Diagnostik mit Oberflächenwellen-Bauteilen zur Bestimmung von Antigen-Antikörper-Reaktionen

S.Rupp, M.von Schickfus
A.Priebe, D.Enders, A.Pucci

Kirchhoff-Institut für Physik; Email: swen.rupp@kip.uni-heidelberg.de

Einleitung

Kernpunkt unserer Forschung ist die Entwicklung eines Sensorsystems zur medizinischen Diagnostik von Immunreaktionen. Ein großes Interesse besteht an einer schnellen Detektion von Antigen-Antikörper-Reaktionen. Geringe Stoffkonzentrationen im Bereich von $\mu\text{g/ml}$ sollen in Plasma, Serum oder Blut nachgewiesen werden. Ziel ist es, ein einfach handhabbares Sensorsystem zu entwickeln, das für den Einsatz in Arztpraxen und Laboratorien geeignet ist. Geeignet hierfür sind Sensoren auf der Basis von Oberflächenwellen, da diese schon erfolgreich in anderen Gebieten wie z.B.: bei der Gasdetektion eingesetzt werden.

Sensordesign

In einem lithographischen Prozeß werden Schallwandler auf einem piezoelektrischen LiTaO_3 -Substrat aufgetragen. Durch Anregung mit Hochfrequenz von 255 MHz lassen sich auf diesem Oberflächenwellen generieren (Abb. 1).

Als Meßgröße wird die rel. Phasenänderung detektiert, die gleich der rel. Schallgeschwindigkeitsänderung ist, die sich aufgrund der Anlagerung des nachzuweisenden Stoffes an der sensitiven Bauteilschicht ändert. Die Sensoren stellen also hochempfindliche Mikro- waagen dar.

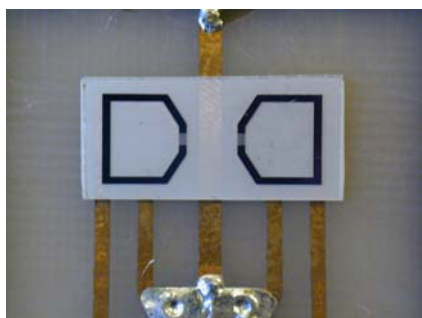


Abb. 1: Induktiv gekoppeltes Oberflächenwellen-Bauteil mit einer Laufstrecke von 3 mm

Die wellenführende Spin-On-Glass Schicht

Zur Erzeugung der Oberflächenscherschwingung (Love-Welle) wird eine wellenführende Schicht benötigt, die eine Schallgeschwindigkeit aufweist die kleiner als die des Substrates von LiTaO_3 mit 4117 [m/s] ist. Die chemische Resistenz gegenüber Antikörperlösungen,

Serum oder Blut ist eine Voraussetzung. Die bisher verwendete SiO_2 -Schicht, die durch Sputtern erzeugt wird, hat den Nachteil, das bedingt durch Ihre Herstellung Pinholes entstehen. Dies hat zur Folge, dass Sie durchlässig für Pufferlösungen ist, dadurch werden die IDT-Strukturen zerstört. Um eine höchstmögliche Sensitivität des Sensors zu erreichen, muß die Schichtdicke sehr genau einstellbar sein. Diese Bedingungen erfüllt das Spin-On-Glass, das in der

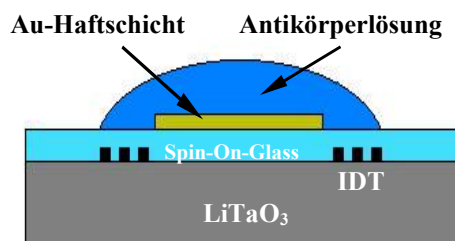


Abb. 2: Schichtaufbau des OFW-Sensors.

Halbleiterindustrie als Dielektrikum eingesetzt wird. Ein Vorteil ist, dass es leicht zu handhaben ist, da es wie Fotolack auf das Substrat aufgetragen werden kann. Die Schichtdicke läßt sich dadurch sehr genau einstellen. Es wurde eine optimale Schichtdicke von 950 nm ermittelt.

Oberflächenpräparation

Die für die Immunreaktion benötigten Antigene und Antikörper werden mit einem neu entwickelten Immobilisierungsverfahren chemisch auf der Sensoroberfläche fixiert. Hierbei wird das Polymer Polyvinylamin (PVAm) verwendet, das aus seinem Einsatz in der Papierindustrie bekannt ist. Die sensitive Goldoberfläche wird zunächst mit Mercaptoethanol (0.8 % in Ethanol) 1 h aktiviert, um -OH Endgruppen zu generieren. Im Anschluss erfolgt die Ankopplung von 3-Aminopropyl-trimethoxysilan, hierfür wird der Sensor in einer 1.7% Lösung in Ethanol für 1.5h gelagert. Daraufhin erfolgt eine Wärmebehandlung des Sensors bei 60° C für 1 h im Umluftofen. Danach wird dieser in einer 1% Lösung von PVAm in H_2O über Nacht gelagert (15 h). Hierbei erfolgt die Anlagerung von PVAm auf der Sensoroberfläche. Ein weiterer Wärmeprozess von 4 h bei 60° C im Umluftofen fixiert das PVAm auf der Sensoroberfläche. Die Aktivierung der NH_2 -Gruppen von PVAm und gleichzeitige Vernetzung mit dem Silan erfolgt mit Glutaraldehyd. Die Sensoren werden hierzu in einem Exsikkator dem Dampf einer 50% Lösung Glutaraldehyd in H_2O 15 h ausgesetzt.

Zur Prozesskontrolle werden die einzelnen Immobilisierungsschritte, wie es in Abb. 3 dargestellt durch IR-Messungen überprüft. Hierfür werden jeweils zwei Bauteile dem gleichen Prozessschritt unterzogen. Die IR-Messungen erfolgen in Reflexion unter

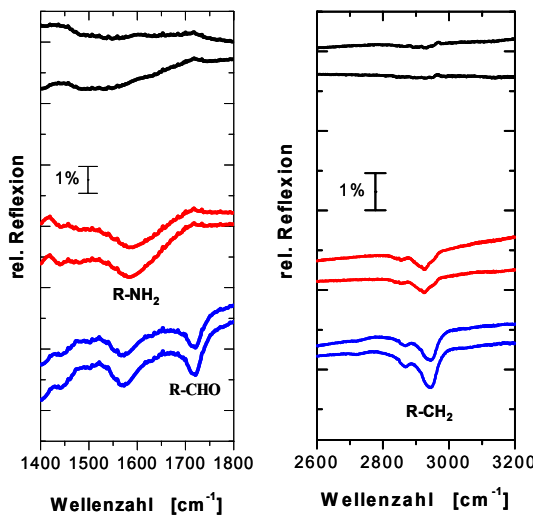


Abb. 3: IR-Messungen zur Bestätigung des Immobilisierungsverfahrens von Antikörper (Mercaptoethanol/Silan schwarz, PVAm rot, Aktivierung mit Glutaraldehyd blau)

einem Winkel von 82° , mit p-polarisiertem Licht. Bei der Anlagerung von PVAm, nach Aktivierung mit Mercaptoethanol und Silan, erkennt man eine deutliche Zunahme der R-NH₂ und R-CH₂ Absorptionsbanden. Die Aktivierung und Vernetzung im nächsten Prozessschritt mit Glutaraldehyd ist in einer Erhöhung der Absorptionsbande von R-CH₂ zu erkennen. Auch die Absorptionsbande der reaktiven Gruppe R-CHO des Glutaraldehyd ist bei 1720 cm^{-1} deutlich zu erkennen.

Messungen zu Antigen-Antikörper-Reaktionen

In Abb. 4 ist zu entnehmen, dass eine Ankopplung von unspezifischen Antikörpern und Proteinen auf der Sensoroberfläche nahezu vollständig unterdrückt wird. Es wird hierbei eine unspezifische Antikörperlösung mit einer Konzentration von 1.2 mg/ml und eine Fibrinogenlösung mit 4 mg/ml verwendet. Die anfängliche drei Grad Phasenänderung bei der unspezifischen Reaktion ist auf die Tropfenmenge ($8\mu\text{l}$) der Lösungen zurückzuführen und stellt somit keine unspezifische Ankopplung dar. Das Driftverhalten des Sensors ist nur temperaturabhängig. Bei einer Antikörperkonzentration von 1.2 mg/ml erhält man nach Abzug der Drift eine Phasenänderung von 52 Grad . Gesicherte Aussagen über das Messergebnis kann bei diesem Sensorsystem schon nach 30 min getroffen werden. Die selektive Ankopplung konnte mit der in Abb.5 gezeigten IR-spektroskopischen Messungen bestätigt werden. Die geringe unspezifische Ankopplung ist hierbei auf das erforderliche Trocknen der Probe zurückzuführen.

Hierbei wurde gezeigt, dass PVAm die Eigenschaft besitzt, eine unspezifische Ankopplung nahezu vollständig zu verhindern, welches ein großer Fortschritt in der medizinischen Diagnostik darstellt. Besonders bei Verwendung von Serum oder Blutpräparaten ist dies entscheidend, da eine unspezifische Ankopplung von Zellen oder Antikörper das Meßsignal verfälschen würde. Desweiteren

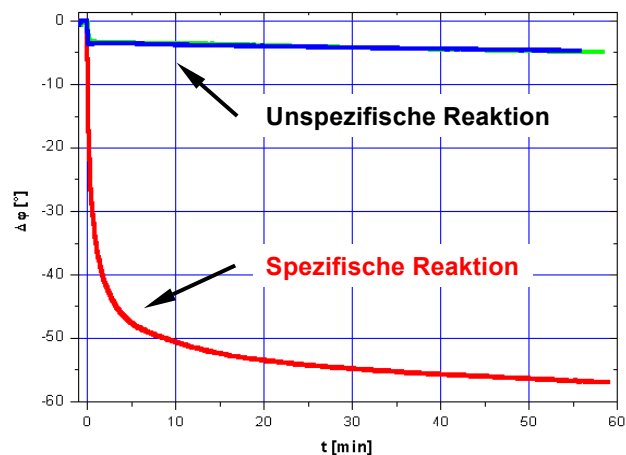


Abb. 4: Oberflächenwellen-Messung in Lösung zur Unterdrückung der Anlagerung unspezifischer Proteine und Ankopplung des spezifischen Antikörpers, bezogen auf den zuvor immobilisierten Antikörper.

ermöglicht PVAm mit nur einem Ankopplungsverfahren verschieden selektive Antigene oder Antikörper auf der Sensoroberfläche zu immobilisieren. Dadurch ist das Anwendungsspektrum des Sensors weit gefächert. Es reicht von der Krebsdiagnostik bis hin zur Detektion von Allergien. Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Messergebnisse wird durch die Verwendung von PVAm erheblich gesteigert.

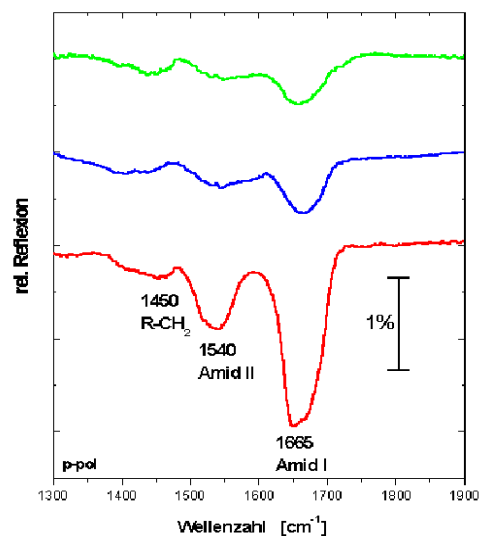


Abb. 5: Relative IR-Reflexionsmessung zur Unterdrückung der unspezifischen Proteine und Ankopplung des spezifischen Antikörpers, bezogen auf den zuvor immobilisierten ersten Antikörper. Die Proben wurden vor der Messung mit Pufferlösung abgespült und anschließend mit N₂ getrocknet.

Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, dass bei einer Verwendung von PVAm als Immobilisierungskunststoff eine unspezifische Anlagerung von Fremdproteinen verhindert wird. Auch die Reproduzierbarkeit wird hierdurch stark erhöht. Durch die Verwendung von Spin-On-Glass als wellenführende Schicht wird die Sensitivität des Sensors und die chemische Resistenz gegenüber Pufferlösungen, zum Schutz der IDT-Strukturen wesentlich erhöht. Eine gesicherte Diagnose kann schon nach 30 min erstellt werden. Dies ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber den etablierten sonstigen Messverfahren wie z.B.: ELISA (Enzyme-linked-Immunesorbent Assay).