

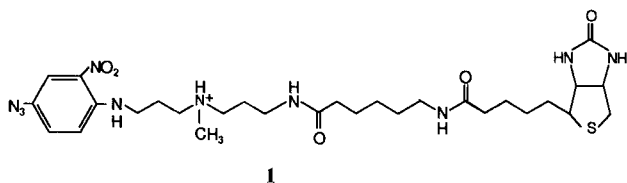
Immobilisierung von Biomolekülen in zweidimensionalen Mustern im Mikrometermaßstab**

David John Pritchard, Hywel Morgan und Jonathan M. Cooper*

Techniken, mit denen der Aufbau von auf Oberflächen immobilisierten Filmen aus Biomolekülen gesteuert werden kann, bieten viele Anwendungsmöglichkeiten, die von Biosensoren über gesteuerte Zellfixierung bis zur molekularen Elektronik reichen. Filme mit einer definierten molekularen Zusammensetzung in z-Richtung wurden zum Beispiel mit der Langmuir-Blodgett-Technik oder über Selbstaggregation hergestellt^[1]. Es war bisher jedoch nicht möglich, mehr als eine Art von Biomolekülen auf der x,y-Ebene einer Oberfläche selektiv anzuordnen, obgleich Fodor et al. schon definierte Bereiche aus mehreren Oligopeptiden oder Oligonucleotiden auf Glasoberflächen hergestellt haben^[2]. Wir beschreiben hier zum ersten Mal eine Methode für das räumlich definierte Auftragen von zwei oder mehr funktionellen Proteinen auf eine Oberfläche unter gleichzeitiger Minimierung unspezifischer Bindungen (NSB, non-specific binding). Eine derartige Technik ist von Bedeutung für die Entwicklung von Mikrosensoren, die für unterschiedliche Analyte geeignet sind. Weiterhin stellen wir als eine mögliche Anwendung die Immobilisierung von Antikörpern vor.

Die üblichen Methoden zum räumlich definierten Auftragen von Molekülen über photolithographische Techniken sind nicht für bioaktive Moleküle geeignet^[3]. Alternativ wurde zur Immobilisierung von Proteinen auf Oberflächen die Photoaktivierung oder Photodesaktivierung oberflächengebundener Kupplungsreagentien, z.B. Organosilane oder Arylazide, eingesetzt^[3–6]. Diese Verfahren wurden jedoch nicht zur Immobilisierung von mehr als einer Sorte funktioneller Moleküle angewendet^[2–6].

Durch Kombination von Selbstaggregation und Photoaktivierung ist es möglich, verschiedene Biomoleküle auf definierte Areale einer Oberfläche selektiv aufzutragen. Diese neue Methode basiert auf der Wechselwirkung von Streptavidin (oder einer deglycosylierten Form von Avidin – Avidin D) mit einem durch eine photoaktive Gruppe funktionalisierten Analogon des Liganden Biotin, Photobiotin **1** (Gegenion Citrat; von Vector Laboratories, Peterborough, Großbritannien).



Photobiotin **1** wurde ursprünglich für die Untersuchung der Hybridisierung von Nucleinsäuren entwickelt^[7] und auch zur Markierung von Proteinen eingesetzt^[8]. Es hat eine endständige Arylazid-Gruppe, die unter Lichtausschluss stabil ist,

aus der aber bei Lichteinwirkung (340–375 nm) eine reaktive Arylnitren-Gruppe entsteht, an die organische Moleküle gebunden werden können^[9]. Das in dieser Studie verwendete Photobiotin **1** enthält einen Spacer, um die sterische Hinderung bei der Bindung zu minimieren. Durch Kombination der NSB-Eigenschaften von Avidin D mit der Aktivierung des Photobiotins **1** gelang es uns, diskrete molekulare Muster in der Ebene eines molekularen Films zu erzeugen.

In Abbildung 1 ist das Immobilisierungsverfahren schematisch dargestellt: Eine Oberfläche wird mit Avidin D, an das anschließend Photobiotin gebunden wird, modifiziert. Dies ergibt eine Matrix, die durch Bestrahlung durch eine Maske mit Molekülen „beschrieben“ werden kann.

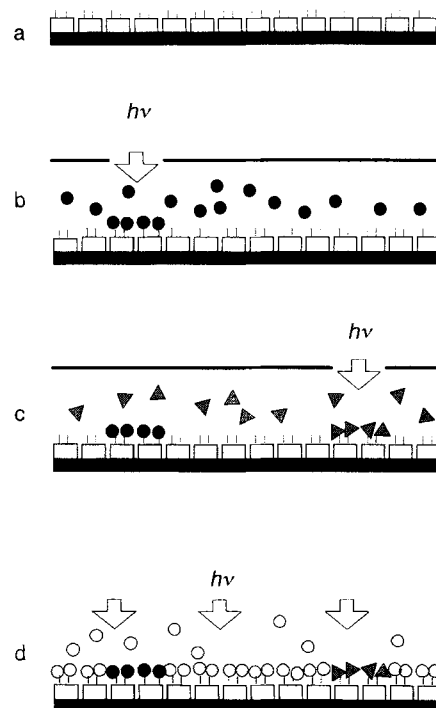


Abb. 1. Schematische Darstellung des Immobilisierungsprozesses: a) Avidin D (\square) mit Photobiotin **1** (\circ) ist auf einer Oberfläche immobilisiert; b) die Bestrahlung ausgewählter Teilbereiche durch eine Maske aktiviert die Photobiotin-Moleküle, die dann ihrerseits gelöstes Protein (\bullet) binden; c) nicht gebundenes Material wird gewaschen und die Prozedur mit einem zweiten Protein (\blacktriangle) wiederholt; d) schließlich wird die ganze Fläche bestrahlt und noch aktives Photobiotin durch Casein (\circ) blockiert.

Mit dieser Methode können Proteine sowohl auf Gold als auch auf SiO_2 immobilisiert werden. Bei Gold wird die Oberfläche zunächst mit einer Thiol-Monoschicht modifiziert, an die Avidin D über ein Carbodiimid als Kupplungsagens gebunden wird. Auf SiO_2 kann Avidin nach Silanisierung und mit einem Protein als Kupplungsagens immobilisiert werden. In beiden Fällen wird die mit Avidin modifizierte Oberfläche mit einer Lösung von Photobiotin inkubiert (Abb. 1a). Durch Bestrahlung ausgewählter Bereiche dieser Oberfläche wird das Photobiotin-Molekül unter Bildung von Arylnitren aktiviert. Diese reaktive Gruppe bindet an alles in der Lösung vorhandene Protein und immobilisiert es so an der Oberfläche (Abb. 1b).

Bei Anwesenheit einer zweiten Sorte von Protein oder einer ganzen Reihe von Proteinen können beliebige Muster durch Bestrahlung der Oberfläche durch eine Maske „geschrieben“ werden (Abb. 1c). Nach Erzeugung des Musters werden alle noch freien Photobiotin-Arylnitren-Gruppen durch Belichtung der gesamten Oberfläche in Anwesenheit eines Blockierungsre-

[*] Dr. J. M. Cooper, Dr. J. Pritchard, Dr. H. Morgan
Department of Electronics & Electrical Engineering
University of Glasgow
G12 8LT (Großbritannien)
Telefax: Int. + 41/330-4907

[**] Diese Arbeit wurde vom Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) gefördert (GR/H31967).

agens, zum Beispiel Casein, inaktiviert (Abb. 1 d). Diese Technik bietet den Vorteil, daß nicht gebundenes Protein unverändert wieder zurückgewonnen werden kann.

Mit diesen Techniken wurden Muster aus Biomolekülen auf Oberflächen gezeichnet. Abbildung 2 zeigt fluoreszierende Mikrolinien aus zwei Proteinen, Kaninchen-IgG und Ratten-IgG, auf einer SiO₂-Oberfläche. Diese Proteine wurden erst mit der Maskentechnik auf der Oberfläche immobilisiert und dann zur Entwicklung des Linienmusters mit einer Lösung versetzt, die mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) markiertes anti-Kaninchen-IgG aus Ziege und mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiertes anti-Ratten-IgG aus Kaninchen enthielt. Abbildung 2 macht deutlich, daß beide Antikörper nur dort an die Oberfläche gebunden werden, wo zuvor Photobiotin durch Belichtung aktiviert wurde.



Abb. 2. Photographie eines SiO₂-Plättchens, das mit zwei fluoreszenzmarkierten Antikörpern beschriftet wurde. Die Antikörper wurden mit der zuvor beschriebenen Methode der Photoaktivierung immobilisiert. Braunrote Fluoreszenz zeigt gebundenes Kaninchen-IgG, grüne Fluoreszenz gebundenes Ratten-IgG an. Die Streifen sind 10 µm breit und durch 10 µm breite Lücken voneinander getrennt. Die schwarzen Bereiche zeigen, daß eine unspezifische Bindung der Antikörper sehr selten ist. Die Länge des Balkens entspricht 10 µm.

Das Auflösungsvermögen dieser lithographischen Technik ist durch die Wellenlänge des Lichtes begrenzt. Dieser Effekt wird durch den Umstand verstärkt, daß die Maske nicht in direktem Kontakt mit der SiO₂-Oberfläche steht, sondern durch einen ca. 1 µm dicken Film einer gepufferten Proteinlösung von ihr getrennt ist. Dennoch können, wie Abbildung 3 zeigt, Linien von 1.5 µm Breite mit TRITC-markiertem IgG gezeichnet werden. Die TRITC-Linien erscheinen in Abbildung 2 weniger rot als in Abbildung 3, weil doppelt belichtet werden mußte (Filter für TRITC und FITC), um das Bild zu erzeugen. Diese Farbbänder-

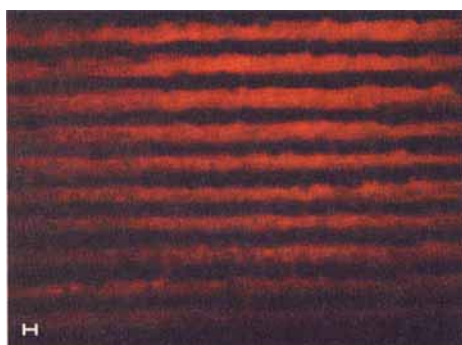


Abb. 3. Photographie eines SiO₂-Plättchens, das mit TRITC-markiertem IgG beschriftet wurde. Die Aufnahme macht die mit dieser Technik erreichbare Auflösung deutlich. Die Linien sind 1.5 µm breit und durch 1.5 µm breite Lücken voneinander getrennt. Sie wurden unter Verwendung einer Maske mit einem 1.5 µm breiten Spalt geschrieben. Die Länge des Balkens entspricht 1 µm.

ung ist nicht auf NSB der FITC-Sonde zurückzuführen, da sie auch bei Abwesenheit der FITC-Markierung auftritt.

Fluoreszenzmikroskopisch war eine unspezifische Bindung von Antikörpern an andere Bereiche der SiO₂-Oberfläche nicht nachweisbar. Mit einem empfindlichen elektrochemischen Test auf mit alkalischer Phosphatase (ALP) markiertem IgG war es jedoch möglich, die Größenordnung der NSB-Effekte auf einer modifizierten Goldoberfläche abzuschätzen (Abb. 4). Die durch

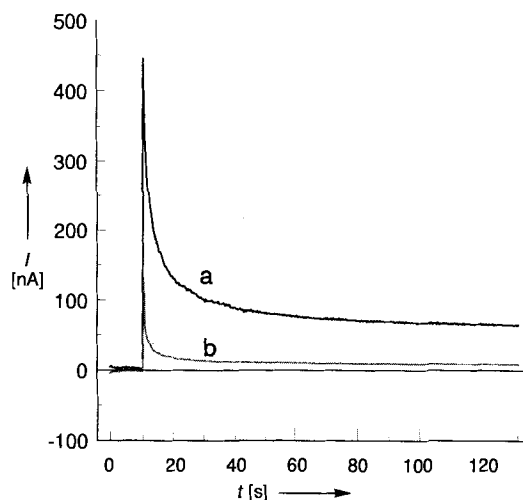


Abb. 4. Signale von zwei Goldelektroden, die mit immobilisierten Antikörpern beschichtet wurden. Weitere Einzelheiten siehe Experimentelles.

NSB erzeugte Gesamtladungsdichte lag bei 0.43 mC cm^{-2} (Signal b), während sie für die spezifische Bindungsreaktion 23.9 mC cm^{-2} betrug (Signal a), was den Schluß zuläßt, daß NSB nur 1.8% der Gesamtbindung ausmacht. Die Messung von Gleichgewichtsströmen (abzüglich der Hintergrundwerte im Puffer) ergab einen ähnlichen Wert für das Ausmaß der NSB (1.9%). Dieser Wert schließt sowohl Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Antikörpern als auch NSB ein.

Die direkte Bindung von ALP-markiertem IgG an eine mit Avidin D beschichtete Goldelektrode wurde ebenfalls über einen elektrochemischen ALP-Test gemessen. Hier ergab sich eine Ladungsdichte von 0.17 mC cm^{-2} , was 0.7% NSB entspricht. Derartige Werte sind ein deutlicher Fortschritt gegenüber den bisher erreichten, und es sollte nunmehr möglich sein, Mikrosensoren räumlich definiert mit Biomolekülen zu belegen. Die Technik hat darüber hinaus den Vorteil, daß sie in lithographische Prozesse integriert werden kann, die industriell zur Herstellung elektronischer Schaltkreise genutzt werden.

Experimentelles

„Beschriftung“ einer SiO₂-Oberfläche mit Mustern aus Antikörpern: In einer mit Phosphat gepufferten Salzlösung (10 mM Phosphatpuffer, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl), pH 7.4 (PBS-Puffer), wurde Avidin D (0.2 mg mL^{-1}) auf einer 1 cm^2 großen Scheibe aus silanisierendem SiO₂ immobilisiert [3]. Anschließend wurde 1 h bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 0.2 mg mL^{-1} Rinder-Serumalbumin (BSA) in PBS inkubiert. Zum Waschen zwischen jedem Einzelschritt wurde ebenfalls PBS verwendet. Die Scheibe wurde dann unter Lichtausschluß 20 min mit einer Lösung von 10 µg mL^{-1} I inkubiert und dann mit einer Lösung von 10 µg mL^{-1} Kaninchen-IgG bedeckt. Die Photoaktivierung des Photobiotins und die Kupplung der jeweiligen Antikörper erfolgte durch 15 min Bestrahlung mit einer 100-W-Hochdruck-Quecksilberdampflampe (185 mm Abstand von der Oberfläche, Strahlungsintensität 9 mW cm^{-2}) durch eine Maske und einen Hoya-SL-Glasfilter, der für Strahlung einer Wellenlänge unterhalb von 300 nm undurchlässig war. Die Bestrahlung mit dem gefilterten Licht hatte bei den polyklonalen IgGs und der ALP keine Aktivitätsabnahme zur Folge.

Der Beschriftungsprozeß wurde daraufhin unter Verwendung einer Lösung von 10 µg mL^{-1} Ratten-IgG wiederholt. Im Verlauf des Photoaktivierungsexperimentes

stieg die Temperatur des Scheibchens um nicht mehr als 5 °C an. Um überschüssige Photobiotin-Reste zu deaktivieren, wurde die Scheibe in eine Lösung von 10 mg mL⁻¹ Casein in PBS getaucht und 15 min bestrahlt. Die Entwicklung des Musters umfaßte zwei Schritte: Zunächst wurde 60 min in einer Lösung von 10 µg mL⁻¹ TRITC-markiertem anti-Kaninchen-IgG aus Ziege in PBS entwickelt und anschließend weitere 60 min in einer Lösung von 10 µg mL⁻¹ FITC-markiertem anti-Ratten-IgG aus Kaninchen in PBS. Alle verwendeten IgGs waren polyklonal und wurden von Sigma bezogen.

Beschriftung einer Goldoberfläche mit Antikörpern: Die Goldoberfläche wurde zunächst mit *N*-Acetylcystein modifiziert, an welches dann Avidin D unter Verwendung eines Carbodiimids als Kupplungsgagens gebunden wurde [10]. Immobilisiert wurden die IgG wie zuvor beschrieben.

Elektrochemische Messungen: Die Goldelektroden (0,2 cm Durchmesser) wurden zunächst 2 h mit einer 5 mM Lösung von *N*-Acetylcystein (Sigma) in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, behandelt und anschließend mit Wasser gewaschen. Die mit *N*-Acetylcystein modifizierten Elektroden wurden 2 h bei 25 °C in einer Lösung mit 10% (w/v) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) in 10 mM Phosphatpuffer inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen. Die mit EDC aktivierten Elektroden wurden bei 4 °C 16 h in eine Lösung von 0,2 mg mL⁻¹ Avidin in 10 mM Phosphatpuffer gelegt. Nachdem die Elektrode mit Wasser gespült worden war, wurde sie 1 h bei Raumtemperatur in einer Lösung von 0,2 mg mL⁻¹ Casein in 10 mM Phosphatpuffer inkubiert. Die mit Avidin beschichtete Goldelektrode wurde mit Photobiotin 1 behandelt, und beide Elektroden wurden mit anti-Kaninchen-IgG aus Ziege überzogen. Jeweils eine der beiden Elektroden wurde anschließend je einem Antigen, das im Überschuß vorlag, ausgesetzt, Kaninchen-IgG (Signal a) und Ratten-IgG (Signal b). Schließlich wurden beide Elektroden 2 h mit ALP-markiertem anti-Kaninchen-IgG aus Ziege, das im Überschuß vorlag, inkubiert und danach gewaschen. Eine Lösung von 10 mM 1-Naphthylphosphat in 100 mM Tris mit 2,7 mM KCl und 137 mM NaCl wurde zu den Elektroden gegeben und die Elektroden nach 5 min bei +320 mV gegen Ag/AgCl ausgeglichen. Zwei Minuten lang wurde ein Strom gemessen, der auf die elektrochemische Oxidation von enzymatisch produziertem 1-Naphthol zurückzuführen ist, welches – anders als 1-Naphthylphosphat – bei diesem Potential elektrochemisch aktiv ist. Wenn ALP-markiertes anti-Ratten-IgG aus Ziege anstelle von ALP-markiertem anti-Kaninchen-IgG aus Ziege verwendet wird, ergeben beide Elektroden Signale des Typs b. Dies zeigt, daß die nichtspezifische Bindung (NSB) von Ratten-IgG an Elektroden, die mit anti-Kaninchen-IgG aus Ziege beschichtet sind, minimal ist.

Eingegangen am 28. Juni,
veränderte Fassung am 5. September 1994 [Z 7081]

Stichworte: Antikörper · Immobilisierung · Immunsensoren · Photolithographie

- [1] P. E. Laibinis, J. J. Hickman, M. S. Wrighton, G. M. Whitesides, *Science* **1989**, *245*, 845–847.
- [2] S. P. A. Fodor, J. L. Reid, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767–773.
- [3] P. Connolly, J. M. Cooper, G. M. Moores, J. Shen, G. Thompson, *Nanotechnology* **1991**, *2*, 160–163.
- [4] C. S. Dulcey, J. H. Georger, V. Krauthmaier, D. A. Stenger, T. L. Fare, J. M. Calvert, *Science* **1991**, *252*, 551–554.
- [5] C. R. Lowe, F. G. P. Earley US-A 4562157, **1985**.
- [6] S. K. Bhatia, J. L. Teixeira, M. Anderson, L. C. Shriver-Lake, J. M. Calvert, J. H. Georger, J. J. Hickman, C. S. Dulcey, P. E. Schoen, F. S. Ligler, *Anal. Biochem.* **1993**, *208*, 197–205.
- [7] A. C. Forster, J. L. McInnes, D. C. Skingle, R. H. Symons, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 745–776.
- [8] E. Lacey, W. N. Grant, *Anal. Biochem.* **1987**, *163*, 151–158.
- [9] P. A. S. Smith in *Azides and Nitrenes. Reactivity and Utility* (Hrsg.: E. F. V. Scriven), Academic Press, London, **1984**, S. 95.
- [10] J. M. Cooper, K. Greenough, C. J. McNeil, *J. Electroanal. Chem. Interfacial. Electrochem.* **1993**, *347*, 267–275.

Die Farben von C₆₀-Lösungen**

Javier Catalán*, José L. Saiz*, José L. Laynez,
Nadine Jagerovic und José Elguero*

Es überrascht, daß eine unpolare Verbindung wie C₆₀ in Lösung verschiedene Farben zeigt, die vom verwendeten Lösungsmittel abhängen^[1, 2]. Beispielsweise wurde über folgende Farben von C₆₀-Lösungen berichtet: pink in Fluorbenzol (FB), magenta in Toluol (T), bläulichviolett in Methoxybenzol (MOB), bräunlich in 1,2-Dimethoxybenzol (12DMOB) sowie braungelb in 1,2,3,5-Tetramethylbenzol (1235TMB). Diese Beobachtungen können nicht auf den Einfluß vom Lösungsmittel zurückgeführt werden; weder Lösungsmittelpolarität noch -polarisierbarkeit spielen eine Rolle.

Ermer^[1] berichtete über die Farben von C₆₀-Lösungen in einer Reihe von aromatischen Lösungsmitteln mit unterschiedlich stark ausgeprägtem π -Donor-Charakter (von Nitrobenzol über Benzol bis Anisol und schließlich 12DMOB). Er regte an, die UV/VIS-Spektren dieser Lösungen im Hinblick auf Charge-Transfer(CT)-Effekte zu untersuchen. Wang et al.^[3, 4] und Rao et al.^[5, 6] schlugen CT-Komplexe zur Erklärung der Wechselwirkung zwischen C₆₀ und *N,N*-Dimethylanilin vor, während Williams und Verhoeven^[7] solche Komplexe für die Wechselwirkung zwischen C₆₀ und 12DMOB oder eines Alkoxycalix[8]-arensulfonats postulierten.

Unabhängig davon untersuchten Scriven und Tour^[2] die Löslichkeit von C₆₀ in 30 aromatischen Lösungsmitteln (Benzol- und Naphthalinderivaten) und beschrieben die Farben der entsprechenden gesättigten Lösungen. Wenn man diese Daten analysiert, scheinen – von gewissen Ausnahmen abgesehen – Farbe und Löslichkeit miteinander zu korrelieren. In den Lösungsmitteln, in denen C₆₀ weniger löslich ist (von 0,3 mg mL⁻¹ in Pyridin bis 1,4 mg mL⁻¹ in *tert*-Butylbenzol), sind die gesättigten Lösungen pink. Im Zwischenbereich (von 1,5 mg mL⁻¹ in Benzol bis 17,9 mg mL⁻¹ in 1,2,4-Trimethylbenzol) sind die gesättigten Lösungen magenta. In den Lösungsmitteln schließlich, in denen sich C₆₀ am besten löst, sind die gesättigten Lösungen bräunlich, so in 1235TMB (20,8 mg mL⁻¹) und in 1-Brom-2-methylnaphthalin (34,8 mg mL⁻¹). Chinolin bildet eine Ausnahme, denn die Lösung ist bräunlich gefärbt, obwohl die Löslichkeit von C₆₀ hier nur 7,2 mg mL⁻¹ beträgt.

Bei ihrer Untersuchung der Löslichkeit von C₆₀ in 47 aromatischen und nichtaromatischen Lösungsmitteln diskutieren Ruoff et al.^[8] nicht die Farben der Lösungen. Jedoch berichten sie, daß sie „im Falle des Cyclohexans bemerkten, daß die anfängliche Zugabe des Lösungsmittels zu C₆₀ zu einer ziemlich intensiven Purpurfärbung führte, die auf eine hohe Löslichkeit hindeuten würde. Nach der Filtration durch ein 0,45-mm-Filter wurde aber nur eine schwach gefärbte Lösung erhalten. Der größte Teil der Färbung rührte von einem flockigen, purpurfarbenen Feststoff her, der in der Lösung lange suspendiert blieb“. Die Löslichkeit von C₆₀ in Cyclohexan ist mit 0,002 mg mL⁻¹ sehr gering^[8].

[*] Prof. Dr. J. Catalán

Departamento de Química Física Aplicada
Universidad Autónoma de Madrid
Cantoblanco, E-28049 Madrid (Spanien)
Telefax: Int. + 91/3974-187

Dr. J. L. Saiz, Dr. J. L. Laynez
Instituto de Química Física Rocasolano Madrid (Spanien)

Dr. N. Jagerovic, Dr. José Elguero
Instituto de Química Médica Madrid (Spanien)

[**] Diese Arbeit wurde vom Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Sonderprojekt „Fullerene“) und von der spanischen Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Projekt Nr. PB90-0117) gefördert.