

DNA-basierte Strichcodes, Nanopartikel und Nanostrukturen für die ultraempfindliche Detektion und Quantifizierung von Proteinen

Susanne Brakmann*

Stichwörter:

Antigene · Antikörper · Immunassays · Proteine

Immunassays sind Techniken, bei denen markierte oder nichtmarkierte Antikörper als Reagentien für die quantitative Bestimmung von Analyten eingesetzt werden. Diese Techniken erfreuen sich großer Beliebtheit in Forschung und klinischer Diagnostik, weil sie präzise, empfindlich und relativ preiswert sind. In zunehmendem Maße erhält jedoch der Nachweis von Proteinen auf extrem niedrigem Konzentrationsniveau Bedeutung, beispielsweise in der Diagnostik von Krankheitsmarkern in Körperflüssigkeiten oder der Detektion von toxischen oder unzulässigen Proteinen in Lebensmittel- und Umweltproben. Obwohl klassische Tests wie ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, Abbildung 1 a) oder RIA (Radioimmunassay) durchaus sehr hohe Empfindlichkeiten und sehr niedrige Detektionsgrenzen (ca. 1 fmol) aufweisen, lassen sich manche Substanzen wie Antigene nur schwer oder gar nicht nachweisen, weil sie in zu geringer Konzentration vorliegen. Gegenwärtig stellt beispielsweise der Nachweis von Prionen-Erkrankungen ein solches Problem dar. Eine wesentliche Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit von Immunassays konnte vor etwa zehn Jahren durch Cantor und Kollegen erzielt werden, die einen Nachweis-Antikörper nicht mit einem Enzym, sondern mit

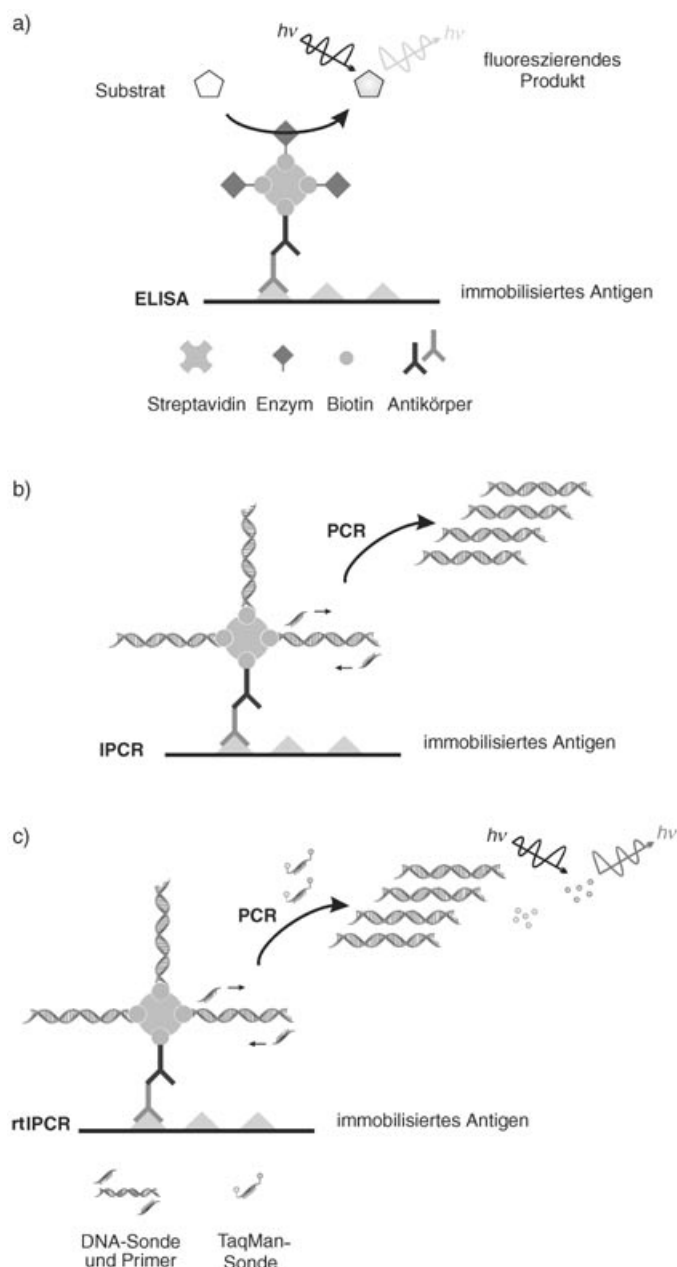


Abbildung 1. a) Prinzip des ELISA-Assays. b,c) Prinzip der Immun-PCR mit „konventionellem Nachweis“ des PCR-Produkts (b) und mit quantitativem Nachweis durch eine FRET-Sonde (Echtzeit-IPCR, c).

[*] Priv.-Doz. Dr. S. Brakmann
Angewandte Molekulare Evolution
Institut für Biologie II
Universität Leipzig
Liebigstraße 18
04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-97-37838
E-mail: sbrakma@rz.uni-leipzig.de

DNA als Reportermolekül verknüpfen: Die gekuppelte Nucleinsäure konnte dann mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) sequenzspezifisch vervielfältigt und anschließend gelelektrophoretisch analysiert werden (Abbildung 1b). An die Stelle der linearen Signalverstärkung des ELISA-Tests tritt somit die exponentielle Verstärkung durch PCR, durch die eine Erniedrigung der Nachweisgrenze um drei bis vier Größenordnungen möglich wird.^[1]

Diese Immun-PCR (IPCR) genannte Methode hat sich inzwischen als sehr gut geeignet für den hoch empfindlichen Nachweis einer Vielzahl an Antigenen, Antikörpern, Pathogenen, Tumormarkern und potenziellen Therapeutika in femto- bis attomolaren Konzentrationen erwiesen und ist deshalb vor allem in der klinischen Diagnostik von großem Interesse. Die Entwicklung einer Vielzahl von Protokollen zeigt zudem, dass IPCR an ein breites Spektrum an Analyten und Immunassay-Verfahren angepasst werden kann (eine aktuelle Übersicht findet sich in Lit. [2]). Aufgrund der enormen Signalverstärkung durch PCR-Amplifikation ist IPCR jedoch nicht nur beim Nachweis spezifischer Proteine sehr empfindlich, sondern auch gegenüber Kontaminationen durch fremde Nucleinsäuren oder gegenüber falsch-positiven Signalen, die infolge nichtspezifischer Antikörperbindung auftreten. Im Einsatz als Routinemethode sind daher die weitestgehende Vermeidung oder Inaktivierung von Verunreinigungen sowie die Verwendung hochgradig standardisierter Protokolle erforderlich.

Unter Verwendung der in den letzten Jahren zu großer Popularität gelangten Echtzeit-PCR-Techniken^[3] (real-time-PCR) konnte die IPCR zu einer Methode für den quantitativen Nachweis von Antigenen ausgebaut werden, die sich auch als Routinemethode und für die parallele Analyse großer Probenaufkommen eignet: Zu diesem Zweck werden der PCR entweder DNA-Intercalatoren (z.B. SYBR-Green) oder FRET-Sonden (z.B. Taq-Man) zugesetzt, die an die entstehende DNA binden und infolgedessen fluoreszieren. Da die Fluoreszenz mit geeigneten Instrumenten direkt während der Amplifikation verfolgt und mithilfe von Eichkurven quantitativ ausgewertet

werden kann, erlaubt die Echtzeit-IPCR (rtIPCR) die reproduzierbare Detektion und Quantifizierung der Analyte im Mikrotiterformat (96er- und 384er-Platten) und darüber hinaus die Aufnahme von Schmelzkurven zur weiteren Charakterisierung der DNA-Amplikons.

Ein wichtiges Beispiel für die Empfindlichkeit und Bedeutung dieser Technik ist der Nachweis des Cytostatikums rViscumin, bei dem Mengen von nur ca. 30 000 Molekülen der Substanz (Konzentration ca. 100 fg mL⁻¹) in standardisierten humanen Serumproben detektiert werden konnten.^[4] Ermöglicht wurde diese enorme Empfindlichkeit vor allem durch die Verwendung der von Niemeyer und Kollegen eingeführten supramolekularen IPCR-Reagentien – oligomerer Konjugate aus Streptavidin, bis-biotinylierter dsDNA und biotinylierten Antikörpern,^[5] die zu multiplen Analytbindungen führen können und daher über einen entropischen Vorteil verfügen. Darüber hinaus verwendeten diese Autoren bei der rtIPCR ein kompetitiv zu replizierendes weiteres DNA-Fragment, das als interner Standard fungierte und außerdem das Signal-Rausch-Verhältnis verbesserte (Abbildung 1c).^[6]

Die rtIPCR hat trotz ihrer beeindruckenden Empfindlichkeit und ihres erfolgreichen Einsatzes für hochgradig reproduzierbare Analysen bislang noch nicht Einzug in die Routinediagnostik gehalten. Ein möglicher Grund hierfür besteht in der sicherlich immer noch komplexen Präparation der IPCR-Sonden: Diese Konjugate aus DNA und Antikörpern sind entweder kovalent oder durch Streptavidin-Biotin-Bindung verknüpft. Während DNA-Antikörper-Konjugate mithilfe von Sulfhydryl- und Aminogruppen an DNA bzw. Antikörper hergestellt werden,^[7,8] bildet man Streptavidin-gekuppelte Konjugate häufig ausgehend von biotinylierten Antikörpern und biotinylierter DNA.^[5,9] In beiden Fällen sind Modifikationen an DNA und Antikörperprotein nötig, die nicht immer trivial und nur gelegentlich bereits kommerziell zugänglich sind.

Nanopartikel-basierte Strichcodes zur Identifizierung von Proteinen

Limitierend für weitere Steigerungen der Empfindlichkeit der rtIPCR könnte das niedrige Verhältnis von Nachweis-Antikörper und DNA (in der Regel 1:1) sowie die langsame Bindung bei der Nachweisreaktion sein, wenn einer der Partner (Analyt oder Antikörper) an einer stationären Phase immobilisiert vorliegt.^[10]

Viele neue Konzepte der amplifizierten Biosensorik (amplified biosensing) kombinieren daher das Immunsay mit der Immobilisierung der beteiligten Biopolymere an Mikro- und Nanopartikeln. Dabei erweist sich nicht nur die Bildung der Erkennungskomplexe in Suspension als Vorteil. Vielmehr ermöglichen kommerziell erhältliche und bereits weit verbreitete magnetische Mikropartikel eine anschließende physikalische Isolierung dieser Immunkomplexe mithilfe eines externen Magneten und sind daher ideal geeignet, um Antigen-Antikörper-Konjugate aus komplexen Mischungen abzutrennen und anzureichern (siehe Lit. [11], zit. Lit.).

In einem kürzlich beschriebenen Verfahren gelang Mirkin und Kollegen der Nachweis eines Krebsmarkers (PSA, prostate-specific antigen) mit einem System aus Antikörper-gekuppelten magnetischen Mikropartikeln und DNA-gekuppelten Gold-Nanopartikeln, die ebenfalls PSA-spezifische Antikörper enthielten, sodass die Goldpartikel in Gegenwart von PSA spezifisch an die magnetischen Partikel binden (Abbildung 2). Die Herstellung von Gold-Nanopartikeln, die sowohl DNA als auch Antikörper tragen, wurde bereits zuvor beschrieben.^[12] Mirkin et al. konnten zeigen, dass freies PSA, das in den Sera von Brustkrebspatientinnen oft nur maximal femtomolar vorliegt,^[13] ohne PCR-Amplifikation bereits in Mengen von ca. 180 Molekülen detektierbar war (Konzentration 30 aM); mit Amplifikation genühten sogar zehnmal weniger, nämlich nur 18 Moleküle (3 aM).^[10]

Mirkins erstaunlich empfindliches Nachweisverfahren zeichnet sich nicht nur durch die Anreicherung des Immunkomplexes mithilfe magnetischer Abtrenntechnik, sondern auch durch

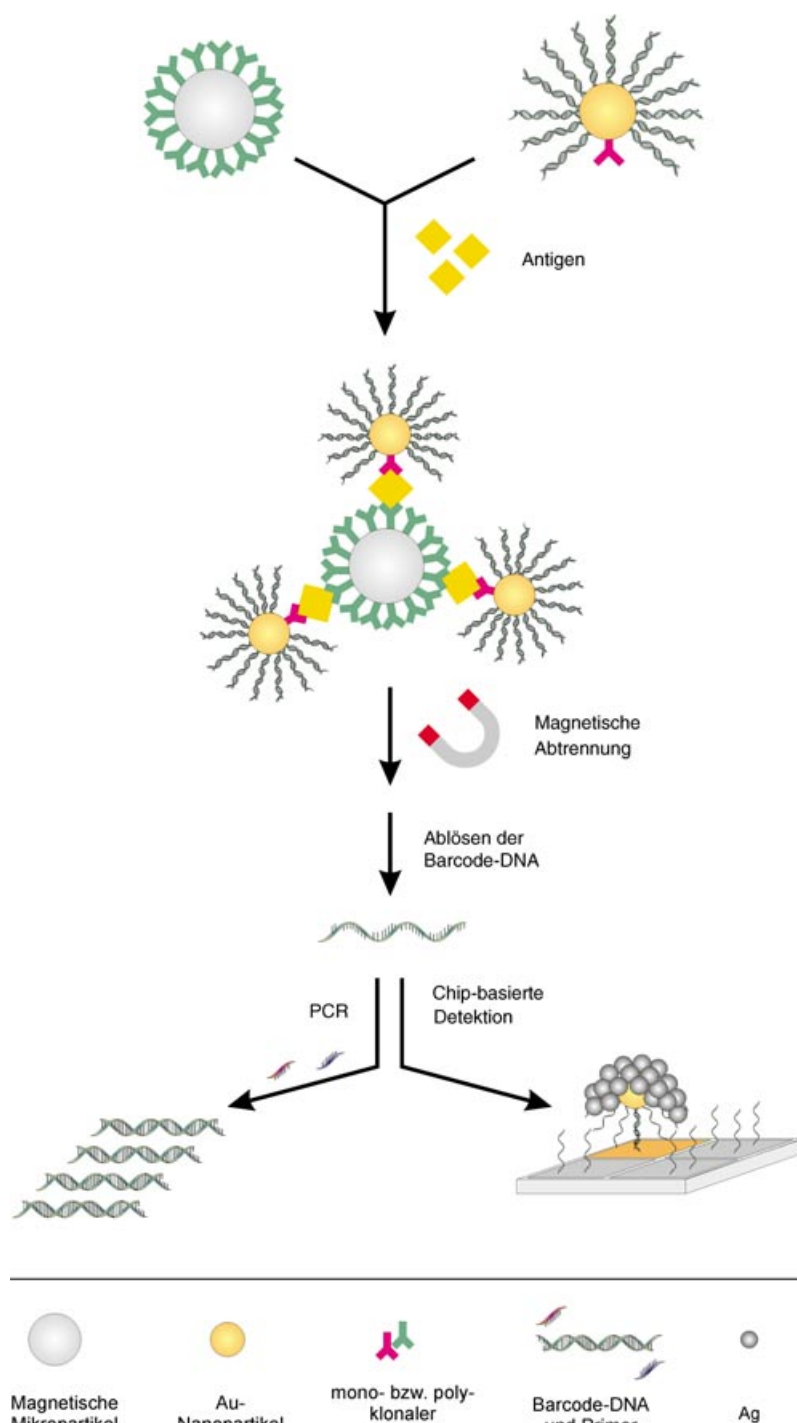


Abbildung 2. Wichtige Schritte in einem Bio-Strichcode-Immunassay. Der erste (monoklonale) Antikörper ist an magnetische Mikropartikel gebunden, die dazu dienen, das Protein aus der Probenlösung anzureichern. Der zweite (polyklonale) Antikörper ist an Gold-Nanopartikel gebunden, die außerdem noch eine Vielzahl von kurzen DNA-Doppelsträngen tragen. Nach Bildung und magnetischer Anreicherung des Sandwich-Komplexes werden die DNA-Stränge abgelöst und können dann entweder durch PCR oder Chip-basiert nachgewiesen werden.

ein hohes Verhältnis von Erkennungskörper zu Marker-DNA (ca. 1:100) aus. Der signalgebende Immunkomplex bildet sich als „Sandwich“ aus magneti-

schon Mikropartikeln, an deren Oberfläche viele Kopien eines monoklonalen Antikörpers (mAB) immobilisiert sind, den von diesen mABs gebundenen An-

tigenen sowie Gold-Nanopartikeln, an deren Oberfläche eine oder sehr wenige Kopien eines polyklonalen Antikörpers und viele Kopien der doppelsträngigen Marker-DNA gebunden sind. Nach der Bildung des Sandwich-Komplexes werden alle magnetischen Partikel oder Partikel-Komplexe mithilfe eines externen Magneten abgetrennt. Dabei bleiben Nanopartikel und Antigene zurück, mit denen keine Komplexbildung erfolgt ist. Marker-DNA von angereicherten Komplexen kann beispielsweise als Matrize in einer PCR-Amplifikation eingesetzt und durch Standardverfahren (z. B. Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung) leicht nachgewiesen werden. Höher empfindliche DNA-Nachweise erzielte Mirkin jedoch durch Aufschmelzen des Doppelstrangs, optionale PCR-Amplifikation und Chip-basierte Detektion, die die Hybridisierung mit komplementärem Strang und den Nachweis der gebildeten Doppelstrang-DNA durch Silberfärbung umfasst. Prinzipiell können in einem solchen Assay auch mehrere Antigene gleichzeitig nachgewiesen werden, wenn jedes Antigen durch eine eigene Marker-DNA-Sequenz codiert wird. Mirkin prägte daher den Begriff „Bio-Strichcode“ für diese DNA-Sequenzen.^[14]

Die Bio-Strichcode-Methode erfordert jedoch – ähnlich wie die rtIPCR – die Synthese von Antikörper-Konjugaten. So müssen beispielsweise Gold-Nanopartikel zunächst nichtkovalent und äquimolar mit dem polyklonalen Antikörper und dann kovalent mit einem 10- bis 100fachen Überschuss an Strichcode-DNA gekuppelt werden. Sowohl die Gewährleistung dieser Stöchiometrie als auch die Stabilisierung und Handhabung der entstehenden Konjugate sind äußerst schwierig. Die Immobilisierung des monoklonalen Antikörpers an magnetischen Mikropartikeln hingegen erfolgt bei Mirkin hoch effizient (90 %) mithilfe kommerzieller Glutaraldehyd-Amin-Kupplungschemie.

Schwierigkeiten könnte bei diesem Verfahren ferner die Erkennung des Antigens durch einen polyklonalen Antikörper bereiten, von dem unter Umständen auch andere Proteine gebunden werden. Ein dadurch verschlechtertes Signal-Rausch-Verhältnis hätte einen deutlichen Empfindlichkeitsverlust zur Folge und würde insbesondere den pa-

rallelen Analyt-Nachweis beeinträchtigen. Es bleibt also abzuwarten, wie tauglich die ultraempfindliche Bio-Strichcode-Detektionstechnik wirklich sein wird.

Bioelektronische Codierung und Detektion von Proteinen

Eine vielversprechende Alternative zu optischen Nachweisverfahren sind elektronische Detektionsverfahren, die zudem durch magnetische Mikropartikel gesteuert und veranlasst werden können.^[11] Diese Verfahren beruhen darauf, dass Nucleinsäuren elektroaktiv sind, weil sie an Elektroden stark adsorbieren und dort Ladungstransferreaktionen eingehen.^[15] Dabei werden vornehmlich die Nucleobasen an Quecksilberelektroden reduziert und an Graphitelektroden oxidiert. Da die an der Elektrodenoberfläche angereicherten Nucleobasen zudem durch Oxidation abgelöst werden, können sie durch potentiometrische Stripping-Analyse (PSA) bereits in sehr niedrigen Konzentrationen (nM) nachgewiesen werden.^[15]

Wang und Kollegen nutzten diese Eigenschaft von DNA, um ein hoch empfindliches, Immunassay-basiertes Nachweisverfahren für Proteine zu entwickeln, das mit dem von Mirkin vorgestellten Verfahren eng verwandt ist.^[16] Das „bioelektrische“ Protokoll beginnt ebenfalls mit der Bildung eines Sandwich-Immunkomplexes ausgehend von Antikörper-gekoppelten magnetischen Mikropartikeln und DNA-funktionalisierten Polystyrol-Partikeln, an die außerdem der Nachweis-Antikörper gebunden ist. Nach magnetischer Abtrennung und Anreicherung der partikelgebundenen Immunkomplexe wird die Marker- oder Strichcode-DNA durch alkalische Denaturierung des Doppelstrangs abgelöst und anschließend einer säurekatalysierten Depurinierung unterworfen. Freie Purine (Adenin und Guanin) werden dann mittels chronopotentiometrischer Stripping-Analyse an einer Elektrode aus pyrolytischem Graphit quantitativ nachgewiesen (Abbildung 3).

Die Autoren waren mit diesem Verfahren in der Lage, ohne jegliche Amplifikation, beispielsweise durch PCR, Mengen von nur 40 000 Molekülen eines

Analyts (Konzentration 13 fM) aufzuspüren. Unter Einbeziehung eines Amplifikationsschritts ließe sich die Empfindlichkeit ohne weiteres um mindes-

tens zwei Größenordnungen steigern. Hohe Empfindlichkeit, Selektivität (kein Hintergrundsignal ohne Analyt oder in Gegenwart eines 1000fachen

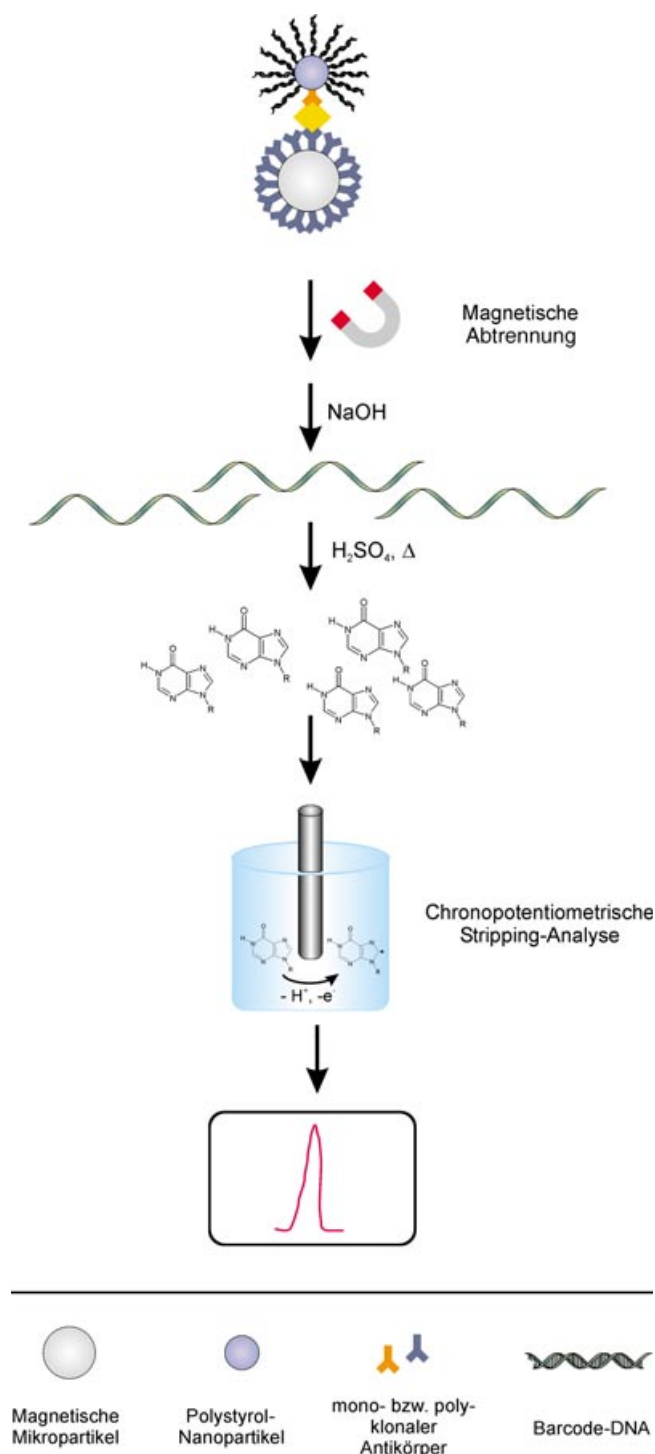


Abbildung 3. Beim elektrischen Strichcode-Assay ist der zweite Antikörper an Kunststoffkugeln gekuppelt, die wiederum viele kurze DNA-Stränge tragen. Nach dem Ablösen der DNA werden die Purine Adenin und Guanin freigesetzt, die durch elektrochemische Analyse nachgewiesen werden können. Dabei liefern Adenin und Guanin deutlich unterscheidbare Signale.

Überschusses an Rinderserumalbumin) und hohe Reproduzierbarkeit des Experiments (Standardabweichung von ca. 5% bei sechs analogen Messungen) lassen auch den elektrischen Proteinachweis mit Strichcode-DNA sehr vielversprechend erscheinen. Abzuwarten bleibt jedoch auch hier, wie sich die Herstellung und die kommerzielle Verfügbarkeit der Sonden entwickelt, damit aus diesem Ansatz eine Routinemethode für die medizinische Diagnostik oder die Proteomanalyse werden kann. Für die Verbreitung jedes der drei vorgestellten Verfahren, rtIPCR, Bio-Strichcodes und elektrische Strichcodes, dürfte letztlich entscheidend sein, wie sich der Markt für neue Technologien entwickelt, der fast immer zunächst mit großer Trägheit auf Neuerungen reagiert.

-
- [1] T. Sano, C. Smith, C. Cantor, *Science* **1992**, 258, 120–122.
 - [2] S. Schiavo, A. El-Shafey, N. Jordan, C. Orazine, X. Zhou, N. H. L. Chiu, I. S. Krull, *PharmaGenomics* **2004**, 36–45.
 - [3] A. Guilietti, L. Overbergh, D. Valckx, B. Decallonne, R. Bouillon, C. Mathieu, *Methods* **2001**, 25, 386–401.
 - [4] M. Adler, M. Langer, K. Witthohn, J. Eck, D. Blohm, C. M. Niemeyer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 300, 757–763.
 - [5] C. M. Niemeyer, M. Adler, B. Pignataro, S. Lenhart, S. Gao, L. Chi, H. Fuchs, D. Blohm, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 4553–4561.
 - [6] M. Adler, R. Wacker, C. M. Niemeyer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 308, 240–250.
 - [7] H. C. Wu, Y. L. Huang, S. C. Lai, Y. Y. Huang, M. F. Shaio, *Lett. Appl. Microbiol.* **2001**, 32, 321–325.
 - [8] R. D. Joerger, T. M. Truby, E. R. Hendrickson, R. M. Young, R. C. Ebersole, *Clin. Chem.* **1995**, 41, 1371–1377.
 - [9] P. P. Sanna, F. Weiss, M. E. Samson, F. E. Bloom, E. M. Pich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 272–275.
 - [10] J. M. Nam, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *Science* **2003**, 301, 1884–1886.
 - [11] I. Willner, E. Katz, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 4724–4737; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4576–4588.
 - [12] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3798–3801; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3685–3688.
 - [13] M. H. Black, M. Gai, R. Ponzzone, P. Sismondi, H. Yu, E. P. Diamandis, *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 467–473.
 - [14] J. M. Nam, S. J. Park, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3820–3821.
 - [15] E. Palecek, M. Fojta, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 75A–83A.
 - [16] J. Wang, G. Liu, B. Munge, L. Lin, Q. Zhu, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 2210–2213; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 116, 2158–2161.