

DNA-Photographie: eine ultraempfindliche Methode zur Detektion von DNA mithilfe photographischer Techniken**

David M. Hammond, Antonio Manetto, Johannes Gierlich, Vladimir A. Azov, Philipp M. E. Gramlich, Glenn A. Burley, Melanie Maul und Thomas Carell*

Die Fähigkeit zur Manipulation und Analyse der genetischen Information von Organismen sowie die Entdeckung, dass kleine RNA-Stränge entscheidende zelluläre Funktionen kontrollieren, haben zur Entwicklung neuer Methoden für die ultraempfindliche Detektion von DNA und RNA geführt.^[1] Man nimmt an, dass solche Techniken die Diagnose genetisch codierter Krankheiten wie Krebs revolutionieren werden. Strebt man eine stärker auf den jeweiligen Patienten abgestimmte Medizin an, so ist die Entwicklung von zuverlässigen, ultraempfindlichen Methoden für den DNA-Nachweis sowie von Methoden zur Isolierung relevanter Gene aus biologischen Proben unerlässlich. Das hier vorgestellte Verfahren bietet eine Lösung für das erstgenannte Problem.

Für den Nachweis von DNA wird weiterhin hauptsächlich die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet, es kommen jedoch stetig neue Methoden für die Detektion von DNA und RNA hinzu. In den letzten Jahren haben beispielsweise die Arbeitsgruppen von Mirkin, Willner und Heeger über die Verwendung von Nanopar-

tikeln, Aptameren oder neuartigen elektrochemischen Geräten zur Detektion von DNA mit Nachweissgrenzen im Pico- oder Femtomolbereich berichtet.^[1–7] Sogar Nachweissgrenzen im Zeptomolbereich wurden erreicht.^[8] All diese Methoden sind technisch überaus anspruchsvoll, was eine breite Nutzung deutlich einschränkt. Wir berichten hier über eine Methode auf der Basis des Verstärkungsprozesses der Schwarzweiß-Photographie, mit der man DNA im Femto- bis Attomolbereich (10^{-18} mol) nachweisen kann (Abbildung 1).

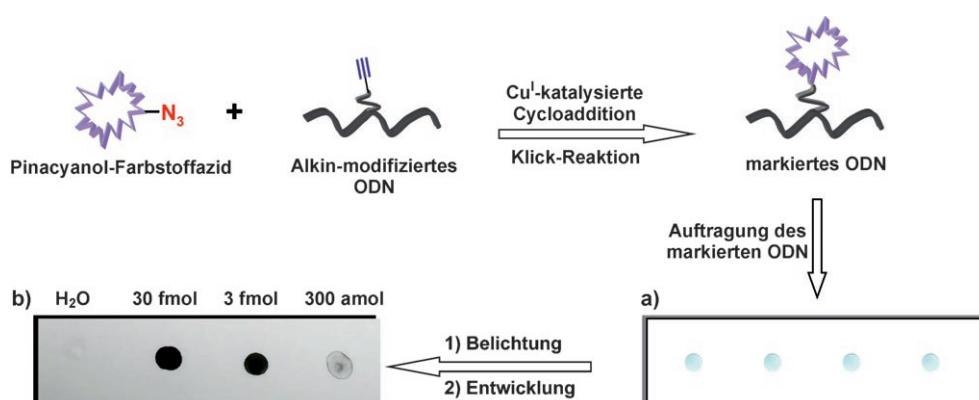


Abbildung 1. DNA-Nachweis mithilfe der Methoden der Schwarzweiß-Photographie. a) Graphische Darstellung eines Photopapiers, das mit verschiedenen Konzentrationen des markierten Oligodesoxyribonucleotids (ODN) beladen wurde. b) Kommerziell erhältliches Photopapier nach Belichtung und Entwicklung. Visueller Nachweis der markierten ODNs bei drei verschiedenen Konzentrationen. 1 µL aufgetragen (x4). Scanner-Reproduktion.

[*] Dr. D. M. Hammond,^[+] Dr. A. Manetto,^[+] Dipl.-Chem. J. Gierlich, Dr. V. A. Azov, Dipl.-Chem. P. M. E. Gramlich, Dr. G. A. Burley, Dipl.-Ing. M. Maul, Prof. Dr. T. Carell
Fakultät für Chemie und Pharmazie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77756
E-Mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de

[+] Diese Autoren trugen in gleichem Umfang zur Arbeit bei.

[**] Wir danken M. Hadden von Ilford, Dr. P. Bergthaller und Dr. K. Wagner für hilfreiche Diskussionen sowie der Volkswagen-Stiftung, der DFG und der BASF AG für finanzielle Unterstützung. A.M. dankt dem EU Marie Curie Training and Mobility Program unter dem Vertrag MRTN-CT-2003-505086 [CLUSTOXDNA] für ein Promotionsstipendium. J.G. und P.M.E.G. danken dem FCI bzw. dem Cusanuswerk für Promotionsstipendien. G.A.B. dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für ein Forschungsstipendium.

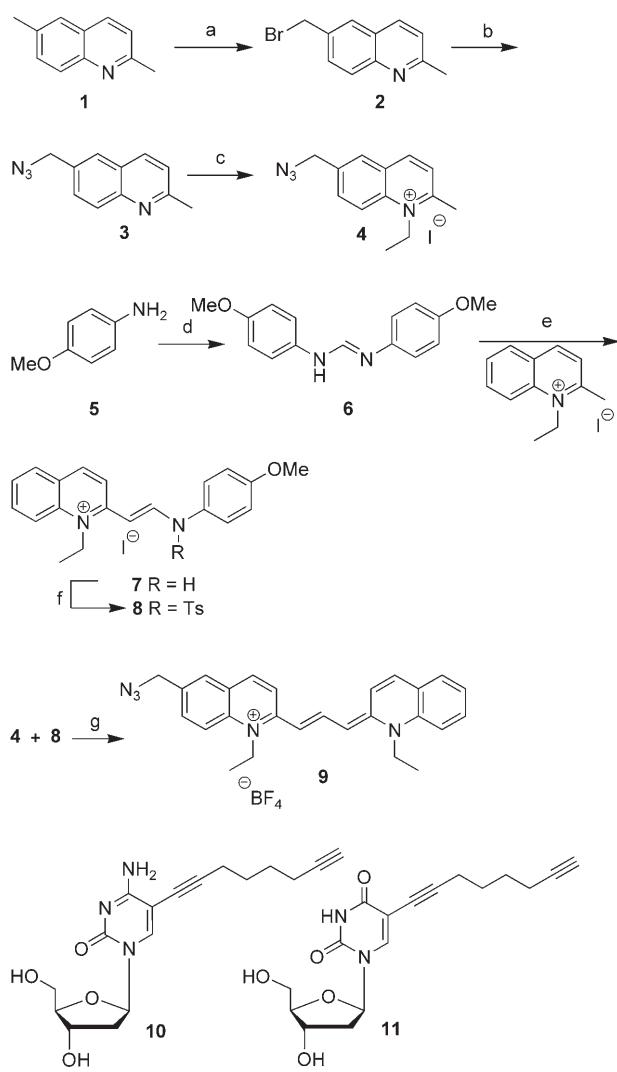
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Bei der Schwarzweiß-Photographie werden Photonen von einer lichtempfindlichen, AgBr-Kristalle enthaltenden Schicht (Film oder Photopapier) eingefangen, wodurch sich Ag_n-Cluster bilden, aus denen sich das latente Bild aufbaut. Bei der anschließenden Entwicklung katalysiert dieser Ag_n-Cluster ($n > 3$) die Reduktion des gesamten AgBr-Kristalls zu Ag⁰, welches das Photopapier schwarz färbt.^[9] Bis heute erfolgte der Nachweis von Analyten anhand einer Silberabscheidung vor allem durch eine Abscheidung von Ag aus der Lösung und nicht durch ein Photopapier.^[10] Diese Abscheidung aus der Lösung liefert Verstärkungsfaktoren von nur etwa 10⁵. Wir berichten hier über die Anwendung des photographischen Prozesses auf der Basis von AgBr-Kristallen in Photopapieren für den Nachweis markierter Biomoleküle. Im Prinzip kann dieser Prozess eine Verstärkung um den Faktor 10¹¹ ergeben,^[9] ähnlich wie bei der Standard-PCR.

Kürzlich berichteten wir über die Modifizierung von Oligonucleotiden mithilfe der Kupfer(I)-katalysierten Azid/

Alkin-Cycloaddition (Klick-Chemie).^[11–15] Um den DNA-Nachweis nun mit dem photographischen Prozess zu verknüpfen, planten wir, spezielle Farbstoffe – so genannte photographische Sensibilisatoren – an die DNA zu knüpfen. Diese Farbstoffe werden in der Schwarzweiß-Photographie eingesetzt, um AgBr-Emulsionen in Photopapier gegenüber Licht im Bereich > 520 nm zu sensibilisieren, in dem AgBr kein Licht absorbieren kann.

Zur Bestimmung der Nachweigrenze dieser Methode untersuchten wir zunächst einen der in der Schwarzweiß-Photographie am weitesten verbreiteten Sensibilisatoren, den Pinacyanol-Farbstoff, in Form seines Azids **9**. Dieser Farbstoff hat den Vorteil, dass er stark am AgBr-Kristall adsorbiert wird, woraus ein effizienter Energie/Elektronen-Transfer zu den AgBr-Kristallen resultiert. Die Synthese des Farbstoffazids sowie die Strukturen des 2'-Desoxycytidinalkins **10**^[16] und des 2'-Desoxyuridinalkins **11**,^[15] die für die Klick-Reaktion benötigt werden, sind in Schema 1 gezeigt.



Schema 1. a) NBS, Benzoylperoxid, CCl_4 , Rückfluss, 47%; b) NaN_3 , DMF, 97%; c) EtI, MeCN, 70% (basierend auf zurückgewonnener Ausgangsverbindung); d) Triethyl-ortho-formiat, 140°C , 55%; e) Triethyl-ortho-formiat, BuOH , Rückfluss, 91%; f) TsCl , DIPEA, CH_2Cl_2 , 70%; g) 1) **4**, DIPEA, Pyridin; 2) Dowex 1x8–200, NH_4BF_4 , 47%. Ts = Toluol-4-sulfonyl, DIPEA = Diisopropylethylamin.

Zuerst wurde kommerziell erhältliches 2,6-Dimethylchinolin (**1**) mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) zur monobromierten Verbindung **2** umgesetzt.^[17] Nucleophile Substitution von **2** mit Natriumazid ergab das Azidderivat **3**, das anschließend mit Ethyliodid zum Chinoliniumsalz **4** alkyliert wurde. In einer parallelen Synthese wurde *p*-Methoxyanilin (**5**) mithilfe von Triethyl-ortho-formiat zum Amidin **6** kondensiert. Dieses wurde anschließend mit 1-Ethyl-2-methylchinoliniumiodid zum Hemicyaninfarbstoff **7** umgesetzt, der in der Folge tosyliert (\rightarrow **8**) und mit **4** zum gewünschten Cyaninazid **9** gekuppelt wurde. Als nächstes wurden drei Oligonukleotide hergestellt, die verschiedene Alkin-modifizierte Nukleotide enthalten (Tabelle 1). Wir bauten 5-Alkinyl-2'-dC (**10**)^[16] in ODN-1 und ODN-2 sowie 5-Alkinyl-2'-dU (**11**)^[15] in ODN-3 über die entsprechenden Phosphoramidite ein.

Tabelle 1: Alkin-modifizierte ODNs für die Klick-Reaktion von **9** mit DNA.^[a]

ODN-Sequenzen (5'→3')	
ODN-1	GCG CTG X C ATT CGC G
ODN-2	GCG CTG XX C ATT CGC G
ODN-3	TTA ATT GAA TTC GAT TY G GGC CGG AY T TGT TTC

[a] X = 5-Alkinyl-2'-dC, **10**; Y = 5-Alkinyl-2'-dU, **11**.

In Gegenwart eines Cu^{I} -Salzes und eines Cu^{I} stabilisierenden Liganden^[18] verlief die Cycloaddition von **9** mit den drei Alkin-modifizierten Oligonukleotiden einer MALDI-TOF-Analyse zufolge quantitativ; dies belegt, dass die Klick-Reaktion sowohl auf Cytidin- als auch auf Uridin-haltige ODNs anwendbar ist. Zur Reinigung wurden die Oligonukleotide anschließend aus Ethanol gefällt. Dank der hohen Ausbeute der Klick-Reaktion genügte bereits dieser einfache Fällungsschritt, um die ODNs vom Überschuss an Farbstoff zu trennen, wie die sauberen HPLCs und MALDI-TOF-Spektren der gefällten ODN-Verbindungen belegen.

Zur Detektion Farbstoff-modifizierter ODNs mithilfe des photographischen Prozesses gaben wir $1 \mu\text{L}$ einer $10 \mu\text{M}$ Lösung von ODN-1, -2 oder -3 unter Dunkelkammerbedingungen tropfenweise auf kommerziell erhältliches, ausschließlich UV- und Blaulicht-empfindliches Photopapier. Das verwendete Photopapier enthielt keine Sensibilisatoren für rotes Licht, wodurch es unempfindlich gegen Licht mit Wellenlängen von > 520 nm war. In einem typischen Experiment belichteten wir das Photopapier weniger als 30 s lang mit Licht von $\lambda > 570 \text{ nm}$ und entwickelten anschließend mithilfe kommerziell erhältlicher Entwicklungsreagenzien (siehe Hintergrundinformationen). Unter diesen Bedingungen führten alle ODNs zu tiefschwarzen Flecken von 2–3 mm Durchmesser auf dem Photopapier. Kontroll-Oligonukleotide ohne Farbstoffe ergaben hingegen keine Flecken (Daten nicht gezeigt), was belegt, dass Farbstoff-modifizierte ODNs mit dieser Methode selektiv nachgewiesen werden können. Bei den Kontroll-ODNs konnte nur bei sehr hohen Konzentrationen von > 50 mM (50 nmol, siehe Hintergrundinformationen) ein schwacher Fleck beobachtet werden.

Als nächstes untersuchten wir die Empfindlichkeit der Methode (Abbildung 2a–c). In einer Verdünnungsreihe, in

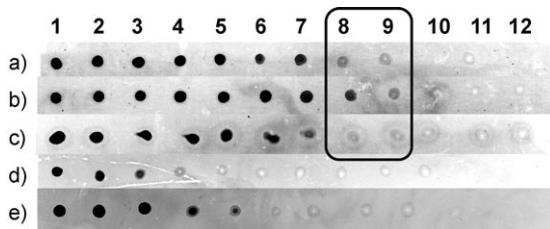


Abbildung 2. Photostreifen mit Sensibilisator-modifizierten ODNs: a) ODN-1; b) ODN-2; c) ODN-3; d) Cy5-ODN; e) Cy3-ODN. Mengen an DNA in H₂O (1 µL aufgetragen): 1: 10 pmol, 2: 1 pmol, 3: 300 fmol, 4: 100 fmol, 5: 30 fmol, 6: 10 fmol, 7: 3 fmol, 8: 1 fmol, 9: 300 amol, 10: 100 amol, 11: 30 amol, 12: H₂O. Der schwarze Kasten zeigt die Nachweisgrenze an.

der Farbstoff-modifizierte DNA-Proben tropfenweise auf das Photopapier gegeben, belichtet und entwickelt wurden, wurden alle ODNs mit einem (ODN-1) oder zwei (ODN-2 und ODN-3) Pinacyanol-Farbstoffmolekülen mit einer Empfindlichkeit von bis zu 300 attomol nachgewiesen. Zum Nachweis genügte dabei allein die Betrachtung des entwickelten Photopapiers mit dem bloßen Auge. Hybridisierung von ODN-3 mit seinem Gegenstrang erhöhte die Nachweisgrenze auf 30 femtomol. Um zu prüfen, ob ein markiertes ODN in einer Mischung mit anderen DNA-Fragmenten nachgewiesen werden kann, verwendeten wir einen mit zwei Farbstoffmolekülen markierten Primer und erzeugten eine 300 bp lange dsDNA, die mit Restriktionsenzymen verdaut wurde. Auch diese Mischung ergab einen tiefschwarzen Fleck (siehe Hintergrundinformationen). Der gesamte photographische Prozess – Auftragen auf das Photopapier, Belichtung, Entwicklung und visuelle Betrachtung – nahm typischerweise weniger als 20 Minuten in Anspruch. Selbstverständlich können auch mehrere Proben auf das Photopapier aufgetragen werden, was eine günstige, zeitsparende und benutzerfreundliche parallele Detektion ermöglicht.

Mit einem Nachweis von 300 attomol DNA liegt unsere Methode im gleichen Empfindlichkeitsbereich wie die meisten Nicht-PCR-Methoden, wobei sie jedoch den Vorteil bietet, dass keine Ausrüstung außer einer photographischen Dunkelkammer benötigt wird. Da bereits mit gewöhnlichem Photopapier eine Nachweisgrenze von 300 attomol erreicht werden konnte, ist abzusehen, dass ein spezielles, für diese diagnostischen Zwecke optimiertes Photopapier die Empfindlichkeit noch weiter verbessern kann.

Als nächstes wollten wir prüfen, ob diese Methode auch für den Nachweis von ODNs anwendbar ist, die mit anderen Farbstoffen zur DNA-Markierung modifiziert wurden. Dazu gaben wir Cy5- und Cy3-markierte DNA ebenfalls tropfenweise auf das Photopapier (Abbildung 2d,e). Wie erwartet konnten auch diese ODNs nachgewiesen werden, allerdings mit einer deutlich reduzierten Empfindlichkeit (100 fmol), was die bessere Eignung der für den photographischen Prozess entwickelten Farbstoffe aufzeigt.

Die Nachweisbarkeit von mit üblichen Farbstoffen markierten ODNs ermöglichte es uns auch zu prüfen, ob sich die Methode prinzipiell für den Nachweis von gesundheitsgefährdenden Pathogenen eignen könnte. Ziel eines ersten Experiments war der Nachweis einer kurzen DNA-Sequenz,

die für einen kleinen Teil des 16S-rRNA-Gens des Pest verursachenden Bakteriums *Yersinia pestis* kodiert.^[19] Eine kommerziell erhältliche DNA-Haarnadelstruktur (molecular beacon, MB)^[20] mit einem 5'-Cy3-Fluorophor und einem BHQ2-Fluoreszenzlöscher am 3'-Ende wurde eingesetzt, um zu untersuchen, ob das Ein- und Ausschalten der Fluoreszenz des MB für unsere Nachweismethode genutzt werden kann. Die Schleifenregion wurde komplementär zur DNA-Sequenz des RNA-Gens entworfen, die unterstrichenen Sequenzen bilden die Stammregion des MB (5'-Cy3-CGCTGCCCTT-GAGCGTGGCTGCAGCG-BHQ2-3', Abbildung 3). In Abwesenheit des *Y.-pestis*-Gens (5'-AGCCACGCCT-CAAGGG-3') befindet sich der MB in der geschlossenen Form, in der die Fluoreszenz durch die Nähe zum BHQ-2-Rest gelöscht wird.^[21] Wurde dieser nicht fluoreszierende MB in hoher Konzentration (1 µL einer 1 µM Lösung) auf das Photopapier aufgetragen, entstand wie erwartet nur ein schwacher Fleck (Spot 3 in Abbildung 3b), was beweist, dass

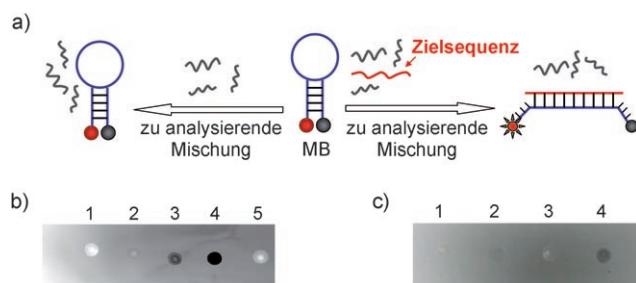


Abbildung 3. a) Das MB-Konzept zur Detektion des *Y.-pestis*-Gens. Der MB öffnet sich in Gegenwart von Zielmolekülen, wodurch sich die Fluoreszenz und dadurch die Fähigkeit des MB zur Sensibilisierung des Photopapiers verstärkt. b) Scanner-Reproduktionen von zwei photographischen Experimenten mit den positiven, schwarzen Spots bei b4 und c4. 1 µL der gepufferten Lösungen wurde aufgetragen. Spots 1 und 5: Puffer (5 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)/HCl pH 8, 5 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂); Spot 2: 10 µM Zielsequenz (Target, T); Spot 3: 1 µM MB; Spot 4: 1 µM MB und 10 µM T. c) Spot 1: Puffer (5 mM Tris/HCl pH 8, 0,5 mM MgCl₂); Spot 2: 0,1 µM MB; Spot 3: 0,6 µM T; Spot 4: 0,1 µM MB und 0,6 µM (600 fmol) T.

BHQ-2 die Sensibilisierung der photographischen Emulsion durch Cy3 verhindern kann; die schwache Färbung kann auf verbleibende Fluoreszenz des gelöschten MB zurückgeführt werden. Auch dieser Befund belegt eindrucksvoll die Empfindlichkeit der Methode. Wenn wir eine Mischung verschiedener DNA-Stränge, unter denen sich die *Y.-pestis*-Sequenz befindet, zu dieser Haarnadellösung geben, öffnet sich der MB, wodurch der Fluorophor vom Löscher getrennt wird und eine Sensibilisierung der AgBr-Kristalle im Photopapier möglich wird. In der Tat war ein großer, schwarzer Fleck sichtbar, als wir diese Mischung (1 µL einer 1 µM Lösung) auf das Photopapier auftrugen, belichteten und den Streifen entwickelten (Spot 4 in Abbildung 3b).

Zum Abschluss untersuchten wir die Nachweisgrenze des Cy3-markierten MB. Wie aus Abbildung 3c ersichtlich ist, konnten wir die Gegenwart des *Y.-pestis*-Gens mit bloßem Auge bis hinab zu 600 fmol (Spot 4) erkennen, selbst wenn

wir zusätzliche genomische DNA zur Lösung gaben (siehe Hintergrundinformationen).

Wir haben eine einfache Technik für den Nachweis von DNA bis hinab zu einer Menge von 300 attomol entwickelt, bei der lediglich die Probenlösung auf unsensibilisiertes Photopapier aufgetragen, dieses einige Sekunden lang belichtet und anschließend das Bild in einer gewöhnlichen photographischen Entwicklerlösung verstärkt wird. Diese Methode fand Anwendung für die Detektion von 600 femtomol eines Zielmoleküls, das mit der Pesterkrankung in Verbindung steht, wobei Hybridisierungssonden (MBs) zum Einsatz kamen. Der Nachweis erfolgt lediglich über die Betrachtung mit bloßem Auge, ohne dass teure Fluoreszenzdetektoren oder Szintillationszählern nötig wären. Die nächsten Aufgaben bestehen nun in der Optimierung des Photopapiers, der Untersuchung anderer photographischer Farbstoffe und der Entwicklung von Methoden, die eine effiziente Isolierung des zu detektierenden DNA-Analyten aus biologischen Proben ermöglichen.

Eingegangen am 12. Dezember 2006,
veränderte Fassung am 27. Februar 2007
Online veröffentlicht am 25. April 2007

Stichwörter: Biosensoren · DNA · Fluoreszenzsonden · Klick-Chemie · Sensibilisatoren

-
- [1] N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1547–1562.
 - [2] H. A. Ho, K. Doré, M. Boissinot, M. G. Bergeron, R. M. Tanguay, D. Boudreau, M. Leclerc, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12673–12676.
 - [3] J. A. Hansen, R. Mukhopadhyay, J. O. Hansen, K. V. Gothelf, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3860–3861.
-

- [4] Y. C. Cao, R. Jin, C. S. Thaxton, C. A. Mirkin, *Talanta* **2005**, *67*, 449–455.
- [5] R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science* **1997**, *277*, 1078–1081.
- [6] Y. Xiao, A. L. Lubin, B. R. Baker, K. W. Plaxco, A. J. Heeger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16677–16680.
- [7] T. Niazov, V. Pavlov, Y. Xiao, R. Gill, I. Willner, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1683–1687.
- [8] J. M. Nam, S. I. Stoeva, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5932–5933.
- [9] T. Tani, *Photographic Sensitivity, Theory and Mechanisms*, OUP, Oxford, **1995**; T. Tani, *Phys. Today* **1989**, 36–41.
- [10] T. A. Taton, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Science* **2000**, *289*, 1757–1760.
- [11] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2598.
- [12] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [13] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [14] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1398–1399.
- [15] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639–3642.
- [16] M. Fischler, U. Simon, H. Nir, Y. Eichen, G. A. Burley, J. Gierlich, P. M. A. Gramlich, T. Carell, A. Solugubenko, J. Mayer, *Small* **2007**, DOI: 10.1002/smll.200600534.
- [17] P. Warner, A. J. Barker, A. L. Jackman, K. D. Burrows, N. Roberts, J. A. M. Bishop, B. M. O'Connor, L. R. Hughes, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2761–2768.
- [18] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
- [19] G. L. Campbell, D. T. Dennis in *Harrison's principles of internal medicine*, 14. Aufl., McGraw Hill, New York, **1998**, S. 975–983.
- [20] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
- [21] S. A. E. Marras, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 122e.