



# Schneller, amplifikationsfreier und sensitiver diagnostischer Test zur Einzelschritt-Multiplexfluoreszenzdetektion von MicroRNA

Zongwen Jin, Daniel Geißler, Xue Qiu, K. David Wegner und Niko Hildebrandt\*

Hans-Gerd Löhmannsröben zum 60. Geburtstag gewidmet

**Abstract:** Die Bedeutung der MicroRNA(miRNA)-Dysregulierung für die Entwicklung und den Fortschritt von Krankheiten sowie die Entdeckung stabiler miRNA in peripherem Blut haben diese kurzen Nukleinsäuren zu Biomarkern der nächsten Generation gemacht. Hier präsentieren wir einen vollkommen homogenen Multiplex-miRNA-FRET-Test, der sorgfältiges biophotonisches Design mit verschiedenen RNA-Hybridisierungs- und Ligationsstufen kombiniert. Im Vergleich zum Stand der Technik in der miRNA-Detektion bietet der Einzelschritt-Einzeltemperatur- und amplifikationsfreie Assay eine einzigartige Kombination von Leistungsparametern. Präzise Multiplex-Quantifizierung von miRNA-20a, -20b und -21 in Konzentrationen zwischen 0.05 und 0.5 nm in einer einzigen 150- $\mu$ L-Probe und Nachweisgrenzen zwischen 0.2 und 0.9 nm in 7.5- $\mu$ L-Serumproben zeigen die Anwendbarkeit der Technologie sowohl für die Hochdurchsatzanalyse als auch die patientennahe klinische Diagnostik.

Mehr als die Hälfte der menschlichen Gene wird von microRNAs (miRNAs) reguliert, und ein Typ von miRNA kann mehrere hundert Zielgene regulieren.<sup>[1-3]</sup> Wegen ihrer Bedeutung in der Krankheitsentwicklung sind miRNAs zu Biomarker der nächsten Generation für die Diagnose und Prognose von Krankheiten geworden.<sup>[4-6]</sup> Dies hat zu einer starken Nachfrage nach Routineanalysen zum quantitativen Nachweis der miRNA-Dysregulierung in Zellen, Gewebe und Blut geführt.<sup>[7,8]</sup> Zwei der größten Nachteile für die Entwicklung von spezifischen und sensitiven miRNA-Detektionstechnologien sind die kurzen Sequenzen (19 bis 25 Nukleotide) und starken Sequenzähnlichkeiten, die in komplexen Proben mit vielen verschiedenen miRNAs (und pre-miRNAs) in unterschiedlichen Konzentrationen unterscheidbar sein müssen.<sup>[9]</sup> Durch hohe Schmelztemperaturunterschiede aufgrund der Sequenzvariabilität von miRNAs sind hybridisierungsbasierte Detektionsformate nur schwer auf große Expressionsprofiling-Studien anwendbar. Auf der anderen Seite limitieren praktische Probleme der Präampli-

fikation in der klinischen Praxis, die Notwendigkeit von miRNA-Markierung oder indirekter Amplifikation und Konvertierungsschritte in komplementäre DNA (oft die primäre Ursache von Variationen) die Anwendbarkeit von Polymerasekettenreaktion(PCR)-basierten Technologien in robusten und reproduzierbaren Sensoren für die klinische Diagnostik.<sup>[10,11]</sup> Biologische Ablagerungen an Oberflächen, niedriger Durchsatz, Schwierigkeiten bei der Hochskalierung oder Miniaturisierung, zeitraubende und arbeitsintensive Vorbereitungs- und Trennschritte und sehr anspruchsvolle und teure Analysetechniken sind weitere Probleme, die die Anwendung in der klinischen Diagnostik begrenzen können.

Eine Übersicht über die vielen miRNA-Detektionstechnologien und ihre Leistungsparameter bezüglich diagnostischer Anwendungen ist in Tabelle 1A dargestellt. Die große technologische Vielfalt und die Bedeutung der spezifischen Anforderungen an unterschiedliche Probenbedingungen und Diagnosezwecke veranschaulichen die Tatsache, dass eine perfekte miRNA-Detektionstechnologie nicht existiert. Obwohl quantitative reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) den sensitiven Nachweis von nur einigen miRNA-Kopien ermöglicht und Microarrays die parallele Detektion von vielen unterschiedlichen miRNAs erlauben, sind neue technologische Entwicklungen, die Benutzerfreundlichkeit mit schneller Zubereitung, Detektion und Analyse, Multiplexing und hoher Empfindlichkeit kombinieren, um die steigende Nachfrage von klinischer miRNA Diagnostik zu befriedigen, nicht kommerziell erhältlich. Darüber hinaus wäre es sehr vorteilhaft, wenn solche Techniken leicht auf andere Nukleinsäure-basierte Biomarker, wie z.B. sequenzspezifische DNA-Targets, die eine wichtige Rolle in der Diagnose und Therapie von genetischen Krankheiten,<sup>[12]</sup> in der Typifizierung und Verfolgung von Infektionserregern,<sup>[13]</sup> in der Forensik,<sup>[14]</sup> und in der Detektion von Einzelnukleotid-Polymerismen (SNPs) antiker DNAs spielen,<sup>[15]</sup> übertragen werden könnten. Unser Fluoreszenztest bietet eine einzigartige Kombination von diagnostischen Leistungsparametern (Tabelle 1B), welche durch eine sorgfältige Implementierung mehrerer spektroskopischer Technologien (FRET, Zeitfenster-Fluoreszenzdetektion, Farbmultiplexing, Korrektur von biospektralem Nebensprechen) in ein vielseitiges Nukleinsäure-Test-Design mit unterschiedlichen Hybridisierungs- und Ligationsstufen ermöglicht wird.

Die optische Detektion basiert auf Zeitfenster-Fluoreszenzdetektion mit Förster-Resonanzenergi transfer („time-gated FRET“: TG-FRET)<sup>[16]</sup> vom lumineszierenden Terbiumkomplex Lumi4-Tb (Tb)<sup>[17]</sup> auf verschiedene organische Farbstoffe (Cy3.5, Cy5 und Cy5.5). Tb hat vier helle und

[\*] Dr. Z. Jin, X. Qiu, Dr. K. D. Wegner, Prof.Dr. N. Hildebrandt  
NanoBioPhotonics (nanofret.com), Institut d'Electronique Fondamentale, Université Paris-Sud und CNRS, 91405 Orsay Cedex (Frankreich)

E-Mail: niko.hildebrandt@u-psud.fr

Dr. D. Geißler  
BAM, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung  
Abteilung 1.10 Biophotonik, Berlin-Adlershof (Deutschland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201504887> zu finden.

**Tabelle 1:** miRNA-Detektionstechnologien und deren Leistungsparameter bezüglich klinischer Diagnostik.

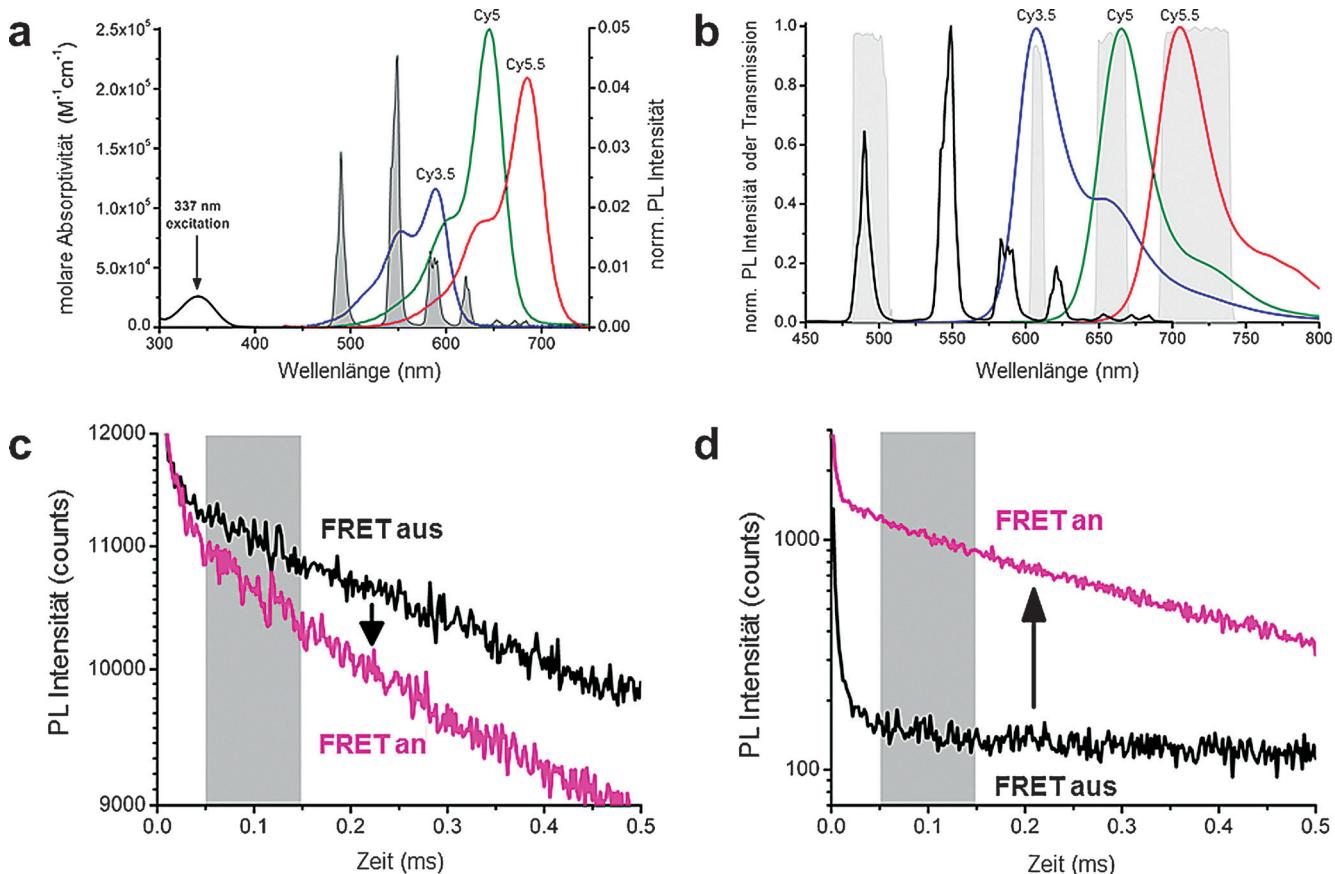
Technologie (Lit.) <sup>[a]</sup>	Quanti- tativ	Schnell <sup>[b]</sup>	Homo- gen <sup>[c]</sup>	Multi- plex	konst. Temp.	Hoch- durchsatz <sup>[d]</sup>	Flüssigphasen- kinetik	amplifika- tionsfrei	POCT <sup>[e]</sup>	Sensi- vität
A										
Northern Blot <sup>[9,25]</sup>	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗	—
Microarray <sup>[6,9,26,30]</sup>	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗	—
RT-PCR <sup>[6,9,25,26,30]</sup>	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✓	✗	✓	++
Nanostring-nCount <sup>[30]</sup>	✓	✗	✗	✓/*	✗	✗	✗	✓	✗	+
Deep-Sequencing <sup>[6,9,30]</sup>	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗	++
Rolling-Circle- Amplifikation <sup>[6,27]</sup>	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✓	+
Elektrochemie <sup>[9,26,30]</sup>	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✓	✓	+
SPR-Bildgebung <sup>[9,25]</sup>	✓	✓	✗	✓/*	✓	✗	✗	✓	✓	+
Oberflächenverst. Raman-Spektr. <sup>[9,26]</sup>	✓	✓	✗	✓/*	✓	✗	✗	✓	✓	+
Biolumineszenz <sup>[9,25,26]</sup>	✓	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✓	+
Fluoreszenzkorrelations- spektroskopie <sup>[9,25]</sup>	✓	✗	✗	✓/*	✓	✗	✓	✓	✗	+
Fluoreszenz-In-situ- Hybridisierung <sup>[6,9]</sup>	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✓	✓	✗	—
QD-basierte Fluoreszenz <sup>[25,26,28]</sup>	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✓	+
Zeitfenster- Fluoreszenz <sup>[29]</sup>	✓	✓	✗	✗	✓	✗	✓	✓	✓	+
B	Zeitfenster-FRET- Ligation (diese Arbeit)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	+

[a] SPR = Oberflächenplasmonenresonanz, QD = Quantenpunkte. [b] Kurze Messzeiten (unter ca. 1 min) und kurze absolute Testdauer inklusive Präparation, Inkubation und Messung (unter ca. 2 h). [c] Einzelschritt-Präparation ohne Wasch- und Separationsschritte (mischen und messen). [d] Tests, die Arrays (mikro oder nano) und/oder Mikrotiterplatten zur parallelen oder seriellen Detektion vieler Proben benutzen (z.B. für klinische Labore). [e] POCT = point-of-care testing (patientennahe Diagnostik-Tests): einfache Tests mit geringen Gerätekosten und Miniaturisierungsmöglichkeiten; ✓ = erhältlich; ✗ = nicht erhältlich; \* = Einzelprobe (d.h. keine parallele Detektion von mehreren Proben, wie z.B. in Microarrays); — = nM bis mM; + = fM bis nM; ++ = zM bis fM.

schmale Photolumineszenz(PL)-Emissionsbanden, die mit den Absorptionsspektren der drei verschiedenen Farbstoffe überlappen (Abbildung 1 a,b). Für die FRET-Paare Tb-Cy3.5, Tb-Cy5, und Tb-Cy5.5 betragen die Förster-Radien 6.5 nm, 6.3 nm und 5.7 nm. Dieser „Einzeldonor-multiple-Akzeptoren“-Ansatz erlaubt Triplex-Tb-auf-Farbstoff-FRET. Um spektrales Nebensprechen der Tb-PL in die Farbstoffdetektionskanäle als auch zwischen den verschiedenen Farbstoffkanälen (Abbildung 1 b) zu vermeiden, verwendeten wir unser vor kurzem entwickeltes Korrekturverfahren für Immunassays,<sup>[18]</sup> welches dem Multiplex-miRNA-Nachweis angepasst wurde (siehe unten).

Die extrem lange Lebensdauer des angeregten Zustands von Tb ( $\approx 2.7$  ms) wurde zur Zeitfenster-Fluoreszenzdetektion genutzt, welche effizient die Hintergrundfluoreszenz der Probe unterdrückte und zum hochempfindlichen Nachweis von miRNA ohne Amplifikation verwendet werden konnte. Durch ein flexibles Assay-Design (Abbildung 2) konnten die Donor-Akzeptor-Abstände für eine Triplex-Signaländerung im Zeitfenster von 0.05 bis 0.15 ms optimiert werden. Weil frei diffundierende Tb- und Farbstoff-Oligonukleotide immer in den Assays vorhanden waren (homogener Test ohne Waschschriften), führte die Zugabe von geringen miRNA-Konzentrationen zu relativ schwacher FRET-Desaktivierung der Tb-PL, wie in Abbildung 1 c gezeigt. Die Farbstoff-Akzeptoren wurden jedoch sehr stark FRET-sensibilisiert (siehe Abbildung 1 d).

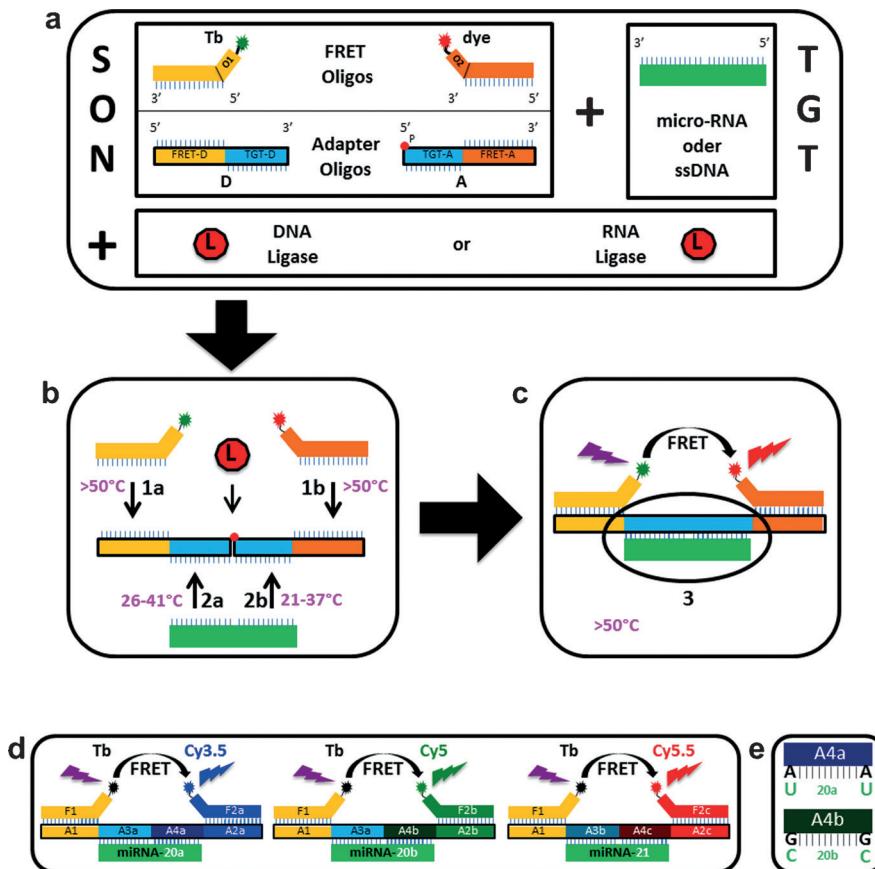
Der Nukleinsäure-Assay wurde entwickelt, um Wasch- oder Trennschritten zu vermeiden und zur Anwendung auf einem klinischen Fluoreszenzimmunoassay-Plattenlesegerät konditioniert (KRYPTOR, Cezanne/Thermofisher). Er kombiniert unterschiedliche Hybridisierungs- und Ligations schritte für die Sonden-Target-Erkennung, welche die Verwendung einer konstanten und niedrigen Arbeitstemperatur ( $\leq 37^\circ\text{C}$ , unempfindlich gegen Störungen von pre-miRNA) selbst für RNAs oder DNAs mit sehr unterschiedlichen Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) ermöglichen. Das Hybridisierungs/Ligations-Konzept bietet maximale Selektivität, Sensitivität und Flexibilität für eine einfache Anpassung an jede kurze Nukleinsäuresequenz. Das Arbeitsprinzip ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Sonde besteht aus zwei FRET-Oligonukleotiden (FRET-Oligos) und zwei Adapter-Oligonukleotiden (Adapter-Oligos). Die FRET-Oligos beinhalten einen Tb-Donor oder einen Farbstoff-Akzeptor, anpassungsfähige Polynukleotid-Überhänge (O1 und O2) und eine spezifische Hybridisierungssequenz. Die Adapter-Oligos sind aus einer spezifischen Sequenz für die Donor- (FRET-D) oder die Akzeptor- (FRET-A) Sonden-Oligos und einer Sequenz (TGT-A oder D), die spezifisch für einen Teil des Targets (miRNA oder ssDNA) ist, zusammengesetzt. Die Assays enthalten ebenfalls Ligase zur Ligation von TGT-D und TGT-A (unter Verwendung von ATP in der Lösung und einer in TGT-A integrierten 5'-Phosphat(P)-Modifikation). Mischen von Sonde und Target führt zur Bildung von stabilen FRET-Adapter-Oligo-Doppelsträngen und semistabilen Ad-



**Abbildung 1.** Photophysikalische Eigenschaften der FRET-Assays. a) Absorptionsspektren (linke Ordinate) des Tb-Donor und der Akzeptor-Farbstoffe Cy3.5 (blau), Cy5 (grün) und Cy5.5 (rot). Zur Verdeutlichung des spektralen Donor-Akzeptor Überlaps ist das PL-Spektrum von Tb (grau) ebenfalls abgebildet. b) PL Emissionsspektren von Tb (schwarz), Cy3.5 (blau), Cy5 (grün), und Cy5.5 (rot). Transmissionsspektren der Tb- und Farbstoffdetektionskanäle sind in grau dargestellt. c + d) Repräsentative PL Abklingkurven im Tb-Detektionskanal (c) und im Cy3.5 Detektionskanal (d) für die Tb-miRNA-20a-Cy3.5 Sonde. „FRET aus“ Kurven wurden in Abwesenheit von miRNA detektiert und repräsentieren reine Tb PL. „FRET an“ Kurven wurden in Gegenwart von miRNA detektiert und repräsentieren Tb PL Desaktivierung (c) und Cy3.5 PL Sensibilisierung (d) durch Tb-auf-Cy3.5 FRET. Graue Bereiche repräsentieren die Detektionszeitfenster.

apter-Target-Komplexen mit einer Adapter-Lücke (Nick) über dem Target (Splint) (Abbildung 2b). Die Ligation des Nick führt zur Bildung von stabilen Doppelsträngen (Abbildung 2c), die Tb-auf-Farbstoff-FRET und damit eine Multiplex-Zeitfenster-PL-Detektion der drei miRNAs miRNA-20a, -20b und -21 ermöglichen (Abbildung 2d). Diese zweistufige Targeterkennung wurde verwendet, um eine hohe Selektivität auch bei sehr homologen Targetsequenzen wie miRNA-20a und miRNA-20b (Abbildung 2e) zu ermöglichen. Die Trennung von FRET und Adapter-Oligos hat den großen Vorteil von universellen Donor- und Akzeptor-FRET-Oligos, die für verschiedene Targets verwendet werden können, weil die FRET-Oligo-spezifischen Regionen der Adapter-Oligos von den Target-spezifischen Regionen unabhängig sind. Darüber hinaus können FRET-Oligos mit unterschiedlichen Überhanglängen (für eine Optimierung des FRET-Abstandes) mit den gleichen Adapter-Oligos verwendet werden, was ein wichtiger Aspekt für die Optimierung der Sonden für die gewünschten Targets ist. Dieses Sondenformat bietet insbesondere für eine Multitargetanalyse deutlich mehr Flexibilität gegenüber einer direkten Markierung der FRET-Paare an die Adapter-Oligos.

Fluoreszenz-miRNA-Detektion und Ligation zur Verbesserung der Selektivität sind keine grundsätzlich neuen Konzepte. Aufgrund des Strangtauschs in der Schleifenregion durch das Target ermöglichen Molecular-Beacon-basierte Fluoreszenzassays sehr hohe Selektivitäten. Auf der anderen Seite büßt dieser Ansatz Sensitivität ein, weil eine Energiebarriere (Strangversatz) überwunden werden muss, um die Haarnadelstruktur zu öffnen. Deshalb benötigen Molecular-Beacon-Assays relativ hohe Targetkonzentrationen (unterer nanomolarer Bereich).<sup>[19]</sup> Hohe Sensitivität ist jedoch eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Diagnostik, und niedrigere Nachweisgrenzen können für Molecular Beacons nur durch Target- oder Signalamplifikation erreicht werden.<sup>[20]</sup> Unser auf Ligation basierender TG-FRET-Assay wurde dahingehend entworfen, komplett „offen“ für das Target zu sein (kein Strangversatz) und ermöglicht daher eine sehr hohe Selektivität (Unterscheidung sehr homologer Targets in einer einzigen Probe) bei 100- bis 1000-fach niedrigeren Konzentrationen (unterer pikomolarer Bereich). Ligations-basierte qRT-PCR-Techniken (auch mit Fluoreszenzdetektion) konnten ebenfalls erhöhte Selektivität bei extrem niedrigen Konzentrationen zeigen,<sup>[21,22]</sup> jedoch



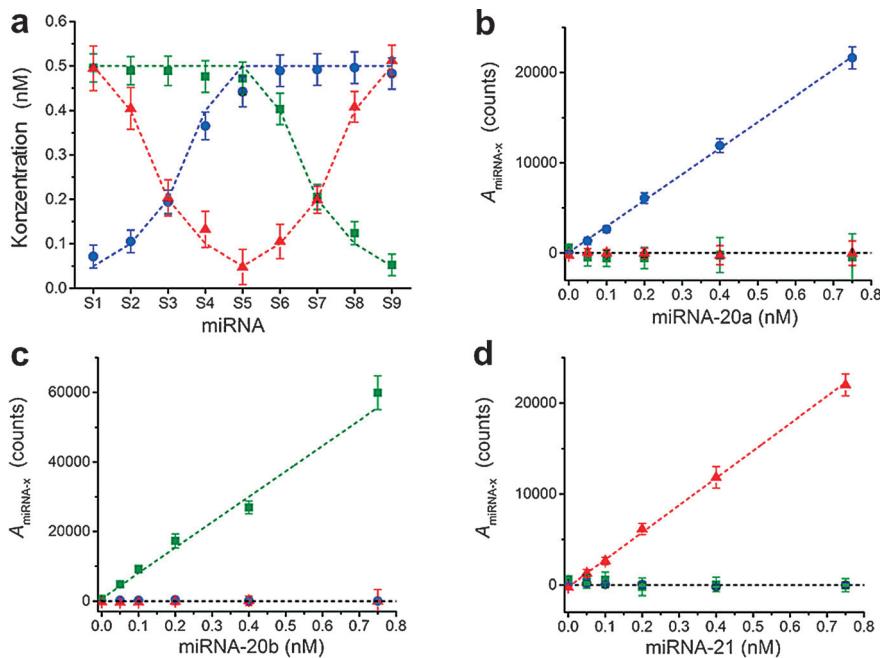
**Abbildung 2.** Prinzip des multiplex miRNA FRET-Assays. A) Jede Sonde (SON) besteht aus zwei FRET Oligos (mit anpassungsfähigen Polynukleotidüberhängen O1 und O2) und zwei Adapter Oligos. Die Assays enthalten auch eine Ligase für die Ligation der Adapter Oligos (unter Verwendung von ATP in der Lösung und einer im Adapter Oligo A integrierten 5'-Phosphat (P) Modifikation). B) Mischen von Sonde und Target (TGT) führt zur Bildung von stabilen FRET-Adapter Doppelsträngen (1a und 1b, Schmelztemperaturen  $T_m > 50^\circ\text{C}$ ) und eines semistabilen Adapter-TGT-Komplexes ( $T_m$  Target- und Assay-spezifisch), mit einem Adapter Nick über dem TGT Splint. Ligation dieses Nick führt zur Bildung stabiler Doppelstränge. C) Stabile SON-TGT-Komplexe ( $T_m > 50^\circ\text{C}$ ) ermöglichen Tb-auf-Farbstoff FRET für den multiplex Zeitfenster PL Nachweis von Nukleinsäure Biomarkern. D) FRET-Assays für triplex miRNA Nachweis. Bezeichnungen auf den verschiedenen Teilen der Oligos (F: FRET Oligo, A: Adapter Oligo) beschreiben die beständigen oder wechselnden Sequenzen der verschiedenen SON-TGT Komplexe (A4a, A4b, A4c und A3b sind RNA, alle anderen Sequenzen sind DNA). E) Vergrößerung der einzelnen Basen in der A4a-miRNA-20a und A4b-miRNA-20b-Basenpaarung.

ohne Multiplexing und unter Beibehaltung der anderen Nachteil von qRT-PCR (Tabelle 1). Deshalb stellt unser schneller, und hochsensitiver Multiplex-FRET-Assay ein grundlegend neues Konzept dar, welches einzigartige Vorteile und ein großes Potential für die miRNA-Diagnostik bietet.

Um die volle Funktionalität unseres Multiplex-Assays zu demonstrieren, wählten wir die Kolonkarzinom-relevanten miRNAs hsa-miR-20a-5p und hsa-miR-21-5p<sup>[23]</sup> zusammen mit hsa-miR-20b-5p (sehr ähnlich zu hsa-miR-20a-5p) sowie deren ssDNA-Analoga (ssDNA-20a/20b/21). Die größte Herausforderung in Bezug auf Selektivität war die Differenzierung zwischen miRNA-20a und -20b, deren Sequenzen sich durch lediglich zwei von 23 Nukleotiden (Abbildung 2e und Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen) unterscheiden. Der Nachweis so starker Sequenzhomologien ist besonders für homogene Tests sehr schwierig, da diese keine Trennungs-,

Wasch- oder Amplifikationsschritte beinhalten. Die Sonde wurde auf Selektivität für den Nachweis von miRNA-20a und -20b optimiert (Abbildungen S1 und S2a,b) und weiter durch die Verwendung von fünf zusätzlichen ssDNA-Targets mit sehr ähnlichen Sequenzen wie ssDNA20a/b verifiziert (Abbildung S2c,d). Obwohl die stärkste Homologie der miRNA-Targets zwei Basenfehlpaarungen betrug, ist zu erwarten, dass sogar einzelne Basenpaar-Unterschiede differenziert werden können. Wie in Abbildung 2d und e gezeigt, resultiert die Diskriminierung von miRNA20a und -20b lediglich aus der TGT-A-Sequenz des zweiten Adapter-Oligos (A4a und A4b). Die  $T_m$ -Werte dieser Oligonukleotide betragen  $30^\circ\text{C}$  und  $20^\circ\text{C}$  (Tabelle S1 für 2 mM Mg<sup>2+</sup>-Pufferbedingung). Die Eingrenzung auf eine einzige Basenfehlpaarung würde zu einer geschätzten  $T_m$ -Differenz von  $5^\circ\text{C}$  führen, was eine immer noch effiziente Diskriminierung erlauben sollte, insbesondere bei einer optimierten Positionierung des Nick über dem Target-Splint.

Eines der wichtigsten Ziele unserer Studie war der Multiplex-Nachweis mehrerer miRNAs oder ssDNAs in einem kleinen Probevolumen. Um dies zu demonstrieren, wurden unsere Sonden für Triplex-Assays von miRNA-20a, miRNA-20b und miRNA-21 (Abbildung 2d) oder deren ssDNA-Analoga entworfen und die Assays auf dem KRYPTOR-Plattenlesegerät durchgeführt. Da die Bindung zwischen miRNA-Target 20a und der Tb-miRNA-20b-Cy5-Sonde zu biologischem Nebensprechen führte, erweiterten wir das Korrekturverfahren für spektrales Nebensprechen für Immunassays<sup>[18]</sup> zu einer effizienten biospektralen Korrektur für die miRNA-Diagnose (siehe Hintergrundinformationen). Obwohl unsere homogenen miRNA-Assays starkes biospektrales Nebensprechen zeigten, erlaubte das aufgerüstete Korrekturverfahren eine sehr effiziente Korrektur für alle drei Targets (Abbildung S3), auch unter komplexen Bedingungen, wenn die jeweils anderen Targets in hohen und niedrigen, niedrigen und hohen oder hohen und hohen Konzentrationen vorlagen (Abbildungen S4 und S5). Für eine fokussierte Darstellung dieser Fähigkeit, sehr niedrige Konzentrationen der drei Targets in verschiedenen Konzentrationen sehr genau messen zu können, untersuchten wir neun Proben mit unterschiedlichen Targetkonzentrationen zwischen 0.05 und 0.5 nM mit unseren homogenen Multiplex-FRET-Assays unter Verwendung der



**Abbildung 3.** Multiplex Detektion unterschiedlicher miRNA Konzentrationen und miRNA Nachweis direkt im Serum. a) Neun Proben (S1 bis S9), die unterschiedliche Mengen von miRNAs enthalten (gestrichelte Linien zeigen die bekannten Konzentrationen) wurden gemessen. Abweichungen von den gestrichelten Linien sind auf experimentelle Fehler zurückzuführen (Pipettieren und/oder Anregungsintensität). b bis d) Kalibrierungskurven, die die Target-spezifischen Signaltintensitäten nach bio-spektraler Korrektur ( $A_{miRNA-x}$ ) für die Targets miRNA-20a (b), miRNA-20b (c) und miRNA-21 (d) in 7.5  $\mu$ L Serumproben zeigen. Alle Assays enthalten alle drei Sonden aber nur ein Target pro Test. Ergebnisse für ssDNA befinden sich in Abbildung S6. Blau: miRNA-20a; grün: miRNA-20b; rot: miRNA-21.

Kalibrierungskurven aus Abbildung S3. Die Ergebnisse (Abbildung 3a für miRNA und Abbildung S6 für ssDNA) bieten eine eindrucksvolle Demonstration der außergewöhnlich hohen Spezifität und Sensitivität unserer Einzelschritt-miRNA-und ssDNA-Tests, auch wenn alle drei Ziele in der gleichen Probe bei unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden sind. Um die hohe Präzision der Einzelmessung (2.5 s pro Messung) zu verdeutlichen, wurde jede Probe nur einmal hergestellt und gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren die aus der biospektralen Korrektur resultierenden Abweichungen. Diese Assaykurven zeigen einen reduzierten linearen dynamischen Bereich (0.05–0.75 nM), der sich eigentlich von ca. 0.03 nM (Nachweisgrenze) bis ca. 3 nM (Sondenkonzentration) erstreckt, wonach die Zugabe von weiteren Targets keine zusätzlichen FRET-Paare erzeugt (Sättigung der Sonden). In einem automatisierten diagnostischen Assay kann dieser lineare Bereich auf höhere Konzentrationen, durch Verdünnung von hochkonzentrierten Proben, die durch das KRYPTOR-Plattenlesesystem mit kinetischen Messungen am Anfang der Sonden-Target-Inkubation automatisch erkannt werden, erweitert werden.

Um eine eventuelle Anwendbarkeit in der patientennahen Diagnostik (point-of-care-testing, POCT) zu demonstrieren, forderten wir unseren Test mit dem direktem miRNA-Nachweis in einigen Mikrolitern Serum heraus. Abbildungen 3b–d zeigen die ausgezeichnete Leistung der Tests für die Detektion der drei verschiedenen miRNA-Targets.

Obwohl weitere Optimierungsschritte vermutlich zu noch höherer Selektivität und Sensitivität führen würden, demonstrieren unsere Serum-basierten Assays die Machbarkeit eines homogenen Multiplex-miRNA- und ssDNA-Nachweises direkt im Serum. Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen (NWG, Nullkonzentrationswert plus dreimal dessen Standardabweichung) der Puffer- und Serum-basierten Tests unter den verschiedenen Bedingungen verwendeten wir die jeweiligen Kalibrierungskurven und berechneten die Standardabweichung von 10 Proben ohne Targets. Alle Assays erreichten sehr niedrige NWG unter 0.032 oder 0.052 nM (5 oder 8 fmol) für miRNA oder ssDNA in Puffer und unter 0.9 oder 2.0 nM (7 oder 15 fmol) für miRNA oder ssDNA in Serumproben (Tabelle 2).

Unter Berücksichtigung unserer bisherigen Ergebnisse zur hochempfindlichen Multiplex-Detektion von Protein-Biomarkern<sup>[18,24]</sup> und der Vielseitigkeit des Assay-Designs ist zu erwarten, dass unsere Technologie auch auf Multiplexing höherer Ordnung, niedrigere NWG und jede andere kurze Nukleinsäuresequenz mit einer Länge zwischen ca. 10 und 26 Nukleotiden übertragen werden kann. Daher wird unser homogener Multiplex-FRET-Assay höchstwahrscheinlich auch Anwendung in anderen wichtigen Nukleinsäureanalysetechnologien finden, wie z.B. der genetischen Variation von mRNA für Erbkrankheiten, Medikamentenresistenz während der Krebstherapie, einzelsträngiger viral RNA oder DNA durch virale Infektionen und Fluoreszenzmikroskopie von in vitro kultivierten Zellen und fixierten oder frisch gefrorenen Gewebeproben, um die molekulare Grundlage und pathologische Entwicklung vieler verschiedener Krankheiten zu untersuchen.

## Danksagung

Wir danken Lumiphore, Inc. für das Geschenk der Lumi4-Reagentien und Honghua Quan für technische Unterstützung. Diese Arbeit wurde von der Europäischen Kommission („Innovative Medicines Initiative“ Projekt OncoTrack), der Agence Nationale de la Recherche France (Projekt NanoFRET) und dem Chinese Scholarship Council gefördert. Université Paris-Sud, CNRS, und Lumiphore haben eine provisorische Patentanmeldung (EP14305794.1) über die beschriebene Methode des homogenen Multiplex-Oligonukleotid-Nachweises eingereicht.

**Tabelle 2:** NWG der verschiedenen miRNA- und ssDNA-Targets unter verschiedenen Versuchsbedingungen (in Abwesenheit und in Anwesenheit von anderen Targets in der Probe).

Target:	miRNA-20a	miRNA-20b	miRNA21	ssDNA-20a	ssDNA-20b	ssDNA-21
Bedingungen <sup>[a]</sup>	NWG in 150 µL Puffer-basierten Proben (in pm)					
X	23	23	21	11	17	25
X + (750 pm Y)	37	29	29	19	29	57
X + (750 pm Z)	36	29	27	15	21	40
X + (750 pm Y und Z)	31	17	23	15	27	86
Mittelwert	32	24	25	15	23	52
Bedingungen <sup>[a]</sup>	NWG in 7.5 µL Serum (in pm)					
X	230	210	250	390	460	610
X + (750 pm Y)	150	250	700	420	450	1900
X + (750 pm Z)	210	1070	740	400	810	1720
X + (750 pm Y und Z)	200	410	1840	470	490	3680
Mittelwert	200	490	880	420	550	1980

[a] Wenn X=20a dann Y=20b und Z=21; wenn X=20b dann Y=21 und Z=20a; wenn X=21 dann Y=20b und Z=20a.

**Stichwörter:** FRET · Klinische Diagnostik · MicroRNA · Multiplexing · Zeitfenster-Fluoreszenzdetektion

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10024–10029  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 10162–10167

- [1] D. P. Bartel, *Cell* **2009**, *136*, 215–233.
- [2] S. L. Ameres, M. D. Horwich, J. H. Hung, J. Xu, M. Ghildiyal, Z. Weng, P. D. Zamore, *Science* **2010**, *328*, 1534–1539.
- [3] S. L. Ameres, P. D. Zamore, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 475–488.
- [4] A. E. Frampton, T. M. Gall, L. Castellano, J. Stebbing, L. R. Jiao, J. Krell, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2013**, *13*, 31–34.
- [5] H. Schwarzenbach, K. Pantel, *MicroRNAs in Medicine*, 1<sup>st</sup> ed., Wiley, Hoboken, **2014**, S. 567–588, ISBN: 9781118300398.
- [6] M. de Planell-Saguer, M. C. Rodicio, *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 869–878.
- [7] M. V. Iorio, C. M. Croce, *EMBO Mol. Med.* **2012**, *4*, 143–159.
- [8] R. Ma, T. Jiang, X. Kang, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2012**, *31*, 38.
- [9] M. de Planell-Saguer, M. C. Rodicio, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *699*, 134–152.
- [10] Z. Gao, H. Deng, W. Shen, Y. Ren, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1624–1630.
- [11] Y. Ren, H. Deng, W. Shen, Z. Gao, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4784–4789.
- [12] R. Redon, S. Ishikawa, K. R. Fitch, L. Feuk, G. H. Perry, T. D. Andrews, H. Fiegler, M. H. Shapero, A. R. Carson, W. Chen, E. K. Cho, S. Dallaire, J. L. Freeman, J. R. González, M. Gratacós, J. Huang, D. Kalaitzopoulos, D. Komura, J. R. MacDonald, C. R. Marshall, R. Mei, L. Montgomery, K. Nishimura, K. Okamura, F. Shen, M. J. Somerville, J. Tchinda, A. Valsesia, C. Woodwark, F. Yang, J. Zhang, T. Zerjal, J. Zhang, L. Armengol, D. F. Conrad, X. Estivill, C. Tyler-Smith, N. P. Carter, H. Aburatani, C. Lee, K. W. Jones, S. W. Scherer, M. E. Hurles, et al., *Nature* **2006**, *444*, 444–454.
- [13] H. Okamoto, Y. Sugiyama, S. Okada, K. Kurai, Y. Akahane, Y. Sugai, T. Tanaka, K. Sato, F. Tsuda, Y. Miyakawa, M. Mayumi, *J. Gen. Virol.* **1992**, *73*, 673–679.
- [14] Y.-L. Wei, C.-X. Li, J. Jia, L. Hu, Y. Liu, *J. Forensic Sci.* **2012**, *57*, 1448–1456.
- [15] G. G. Fortes, C. F. Speller, M. Hofreiter, T. E. King, *Bioassays* **2013**, *35*, 690–695.
- [16] N. Hildebrandt, K. D. Wegner, W. R. Algar, *Coord. Chem. Rev.* **2014**, *125*, 273–274.
- [17] J. Xu, T. M. Corneillie, E. G. Moore, G.-L. Law, N. G. Butlin, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19900–19910.
- [18] D. Geißler, S. Stufler, H.-G. Löhmansröben, N. Hildebrandt, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1102–1109.
- [19] M. B. Baker, G. Bao, C. D. Searles, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e13.
- [20] J. Lu, A. Tsurkis, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e100.
- [21] Y. Q. Du, P. F. Gao, W. Wang, T. T. Wang, Y. Chang, J. Wang, C. Z. Huang, *Analyst* **2013**, *138*, 5745–5750.
- [22] J. Zhang, Z. Li, H. Wang, H. Jia, J. Yan, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9465–9467.
- [23] A. J. Schetter, S. Y. Leung, J. J. Sohn, K. A. Zanetti, E. D. Bowman, N. Yanaihara, S. T. Yuen, T. L. Chan, D. L. Kwong, G. K. Au, C. G. Liu, G. A. Calin, C. M. Croce, C. C. Harris, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2008**, *299*, 425.
- [24] D. Geißler, L. J. Charbonnière, R. F. Ziessel, N. G. Butlin, H. G. Löhmansröben, N. Hildebrandt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1396–1401; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1438–1443.
- [25] K. A. Cissell, Y. Rahimi, S. Shrestha, E. A. Hunt, S. K. Deo, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2319–2325.
- [26] H. Zhang, Y. Liu, X. Fu, L. Yuan, Z. Zhu, *Microchim. Acta* **2015**, *182*, 661–669.
- [27] Y. Cheng, X. Zhang, Z. Li, X. Jiao, Y. Wang, Y. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3268–3272; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3318–3322.
- [28] A. Fang-ju Jou, C.-H. Lu, Y.-C. Ou, S.-S. Wang, S.-L. Hsu, I. Willner, J. A. Annie Ho, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 659–665.
- [29] L. Jiang, D. Duan, Y. Shen, J. Li, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *34*, 291–295.
- [30] P. Mestdagh, N. Hartmann, L. Baeriswyl, D. Andreassen, N. Bernard, C. Chen, D. Cheo, P. D'Andrade, M. DeMayo, L. Dennis, S. Derveaux, Y. Feng, S. Fulmer-Smentek, B. Gerstmayer, J. Gouffon, C. Grimley, E. Lader, K. Y. Lee, S. Luo, P. Mouritzen, A. Narayanan, S. Patel, S. Peiffer, S. Rüberg, G. Schroth, D. Schuster, J. M. Shaffer, E. J. Shelton, S. Silveria, U. Ulmanella, V. Veeramachaneni, F. Staedtler, T. Peters, T. Guettouche, L. Wong, J. Vandesompele, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 809–815.

Eingegangen am 29. Mai 2015

Online veröffentlicht am 29. Juli 2015