

Etablierung verschiedener Bead-basierter Multiplexmethoden mit einem Suspensions-Array-System für molekulardiagnostische Zwecke

Lars Radke, Diana López-Hemmerling, Annika Lubitz, Christoph Giese, Franz-Xaver Wildenauer und Marcus Frohme

Zusammenfassung

Die simultane Bestimmung mehrerer Analyten und die Erstellung komplexer Parameterprofile erlangt immer größere Bedeutung in der heutigen Labordiagnostik. Die Bead-basierte Multiplexanalytik bietet hier eine flexible, schnelle und einfache Methode zur Erstellung individueller Analysen. Aufgrund der Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten, die diese moderne Nachweismethode im Bereich molekularbiologischer Fragestellungen bietet, ist die Etablierung der Bead-basierten Multiplexanalytik im Labor für Molekularbiologie und funktionelle Genomik der Technischen Hochschule Wildau von großem Nutzen.

Zur Einarbeitung in das Testsystem wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-2, IL-4, IFN- γ und TNF- α in Zellkulturüberständen mit kommerziellen Fertigsystemen gemessen und mit mRNA-Expressionsraten der gleichen Proben verglichen. Des Weiteren wurde ein Testsystem zum Nachweis von humanen Antikörpern der Klassen IgG und IgM sowie deren antigen-spezifischer Anteil in Zellkulturüberständen entwickelt. Außerdem konnte durch die erfolgreiche Detektion von DNA-gekoppelten Beads mittels markierter Oligonucleotidsequenz die Kopplung und die Anwendbarkeit der Methode auf Bindungsexperimente mit Nucleotidsequenzen gezeigt werden.

Abstract

The simultaneous determination of multiple analytes and the generation of complex parameter profiles gains increasing importance in today's laboratory diagnostics. The bead-based multiplex assay is offering a flexible, rapid and easy to handle method for the creation of individual analyses. Because of the multitude of applications this modern detection system offers, the establishment of the bead-based multiplex technique is of great benefit for the Laboratory for Molecular Biology and Functional Genomics of the Technical University of Applied Sciences Wildau.

To familiarize with the testing system the concentrations of the cytokines IL-2, IL-4, IFN- γ and TNF- α in cell culture supernatant were analysed with commercially available assays and compared with mRNA expression ratios of the same samples.

Furthermore a custom testing system was developed for the detection of human IgG and IgM antibodies and also antigen specific antibodies in cell culture supernatants. The assignability of the method to binding experiments with nucleotide sequences could be shown by the successful detection of DNA-modified beads by conjugated oligonucleotides.

1 Einführung

Zunehmende Kenntnisse über die Komplexität von Reaktionswegen und Krankheiten führen zu einer wachsenden Anzahl an zu untersuchenden Parametern in diagnostischen Analysen. Die steigende Nachfrage nach dem simultanen Nachweis verschiedener Analyten in einer Probe führte zur Entwicklung von multiplexen (lat. vielfach) Detektionsmethoden. Unter diesen

Verfahren nimmt die Bead-basierte Multiplexanalytik einen immer größeren Stellenwert ein [1].

Multiplexe Verfahren führen zur Ersparnis von Reagenzien, Probenvolumen, Zeitaufwand und abhängig von der Methode zur Einsparung von Kosten. Im Allgemeinen kommt es zur Verbesserung der Aufwand-Nutzen-Relation.

Die bei diesem Verfahren verwendeten Mikropartikel (im Englischen Beads, »Kügelchen«, genannt) erhalten

ihre analytischen Eigenschaften durch die Kopplung von Biomolekülen wie Antikörper, Antigene, Enzyme, Lektine, Rezeptoren, modifizierte DNA-Stränge oder Aptamere. Die Kopplung erfolgt dabei hauptsächlich durch kovalente Verfahren (EDC-NHS Kopplung von Carboxylgruppen mit Aminogruppen). Die Beads bestehen aus Polystyrol und unterscheiden sich durch intrinsische Farbstoffe. Durch den parallelen Einsatz mehrerer Beadklassen, welche durch Kopplungsreaktionen mit unterschiedlichen Fängermolekülen analytisch funktionalisiert wurden, lassen sich aus einer Probe mehrere Analyten gleichzeitig bestimmen. Dies führt zu einer großen Vielfalt an parallelen Untersuchungsmöglichkeiten. Neben immunologischen Nachweisen können auch Rezeptor-Liganden-Bindungen, Enzymkinetiken oder Reaktionswege und Signalketten untersucht werden und selbst der Nachweis von einzelnen Genen, wie zum Beispiel PCR-Produkten, ist möglich.

Die Identifizierung der Beads und die Quantifizierung der gebundenen Analyten erfolgt dabei mittels Durchflusszytometrie. Bei der von Luminex entwickelten so genannten »xMAP«-Technologie enthalten die Beads zwei intrinsische Fluoreszenzfarbstoffe mit bis zu 10 verschiedenen Intensitäten, sodass sich bis zu 100 spektralverschiedene Beadpopulationen parallel differenzieren lassen. Dabei werden die intrinsischen Beadfarbstoffe mit einem 635 nm Diodenlaser angeregt und bei 645–669 nm bzw. bei >712 nm mit Avalanche-Photodioden gemessen. Die Anregung des fluoreszenzmarkierten Analyten erfolgt bei 532 nm durch einen YAG-Laser und wird mittels Photomultiplier bei 563–587 nm detektiert. Als Reporterfarbstoff eignen sich besonders Phycoerythrin, Cy3 oder Alexa 532. Zusätzlich wird mit einer Avalanche-Photodiode bei 635 nm das Seitwärtsstreulicht jedes detektierten Partikels gemessen und so ausgeschlossen, dass Beadaggregate die Messung verfälschen [1]. Die Abbildung 1 zeigt das Messprinzip der Luminex-Technik.

In der Multiplexanalytik sind verschiedene Assayformate möglich. In der Regel werden Sandwich-Formate genutzt. Seltener werden kompetitive Assayformate verwendet. Bellisario et al [2] zeigten, dass auch die Kombination von kompetitiven und Sandwich-Assay im selben Testansatz möglich ist.

In den folgenden vier Absätzen wird kurz auf die verschiedenen eingesetzten Moleküle bzw. Molekülklassen eingegangen:

Antikörper zirkulieren im Körper und binden an spezifische Partikel und Moleküle, so genannte Antigene.

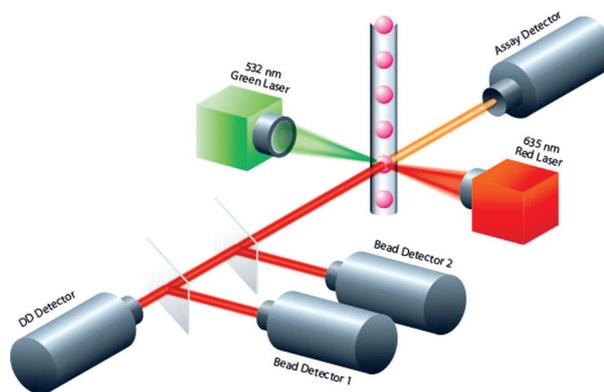


Abb. 1: Messprinzip der Luminex-Technik. Die Beads werden in einem Flüssigkeitsstrom aufgereiht und mit zwei Lasern gleichzeitig angeregt. Der rote Diodenlaser dient der Anregung der intrinsischen Farbstoffe, die mit zwei Avalanche-Photodioden (Bead Detector 1 und 2) gemessen werden. Zusätzlich werden mit dem Dublettendiskriminator (DD-Detektor) Beadaggregate erkannt. Mit dem grünen YAG-Laser werden die fluoreszenzmarkierten Detektionsmoleküle angeregt. Dieses Signal wird von einem Photomultiplier (Assay-Detektor) gemessen [3].

Toxine, andere niedermolekulare Stoffe und sogar Viren werden inaktiviert, indem ihre Bindung an deren Rezeptoren bzw. Ziel-Zellen unterbunden wird. Durch die hohe Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion werden Antikörper als Detektionsmolekül in einer Reihe von Nachweisverfahren in der Biotechnologie und Medizin eingesetzt [4, 5].

Zytokine sind meist einfache Polypeptidketten oder Glycoproteine mit regulatorischer Wirkung, die von Leukozyten und einer Vielzahl anderer Körperzellen sekretiert werden. Zu ihnen zählen die Interleukine, die Interferone, Tumornekrosefaktoren, Chemokine und koloniestimulierende Faktoren. Die pleiotrope Wirkung der Zytokine beinhaltet eine Vielzahl von Effekten auf Zellen des Immunsystems und bei der Modulation von Entzündungsreaktionen, sowie dem Zellwachstum und der Signalübertragung, weshalb anhand der Zytokinmuster wichtige diagnostische Aussagen getroffen werden können [6].

Aptamere (von lat. *aptus*, passen und griech. *meros*, Gebiet) sind kurze einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide, welche eine Vielzahl dreidimensionaler Strukturen annehmen und so verschiedenste Moleküle mit hoher Affinität binden können. Dabei beruht die Bindung auf der strukturellen Passfähigkeit der Oberfläche, die durch die Sequenz entsteht. So gibt es Aptamere gegen die unterschiedlichsten Bindungspartner, wie Viren, Proteine, Peptide und kleinste Moleküle [7, 8].

Der Cytomegalovirus (CMV) ist ein β -Herpes-Virus, welcher in weiten Teilen der Welt endemisch ist und Cytomegalie verursacht. Dies ist die derzeit häufigste

Ursache von Störungen während der Entwicklung des Kindes im Mutterleib [9, 10] und stellt bei immunsupprimierten Patienten eine lebensbedrohliche Krankheit dar [11]. Das Polypeptid 65 (pp65) ist ein strukturelles Phosphoprotein der Virenmatrix des CMV mit einem Molekulargewicht von 65 kDa. Aufgrund seiner immundominanten antigenen Wirkung handelt es sich derzeit um den am besten etablierten Parameter beim Nachweis einer aktiven CMV-Infektion [12, 13].

Ziele der experimentellen Arbeit sind die Zytokinmessungen in Zellkulturüberständen von Stimulationsexperimenten mit PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) und verschiedenen Wirkstoffen sowie die Bestimmung von Antikörpertitern ebenfalls in Zellkulturüberständen mit einem selbstentwickelten Bead-basierten Testsystem. Dabei werden verschiedene Fänger-moleküle, wie Antigene, Antikörper und Aptamere verwendet. Die Ergebnisse einer Genexpressionsanalyse, die mit den Ergebnissen der Zytokinmessung verglichen werden, wurden bereits im Rahmen einer früheren Arbeit erhalten.

2 Material und Methoden

Für die Zytokinbestimmung wurden von der ProBio-Gen AG aus Berlin Zellkulturüberstände aus Stimulationsexperimenten bereitgestellt. Dabei handelte es sich um Zellkulturen von PBMC aus Vollblutproben adulter gesunder Spender in RPMI-Medium (Roswell Park Memorial Institute Medium) mit 10% FKS (Fetales Kälberserum). Diese wurden zur Stimulation mit verschiedenen Wirkstoffen versetzt: SEB (Staphylococcal Enterotoxin B) und PWM (Pokeweed Mitogen), einem Lektin sowie OKT-3 (ein monoklonaler Antikörper gegen das CD3 Oberflächenantigen auf T-Lymphozyten) und ConA (Concanavalin A), ebenfalls ein Lektin. Die Probenahme der Zellen und Kulturüberstände erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung bis zur 72. Stunde. Die Analyse erfolgte mit dem Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Assay, 8-Plex welcher unter anderem die Zytokine IL-2, IL-4, TNF- α und IFN- γ quantifiziert. Dabei wurde jeweils nach den Angaben der Hersteller verfahren. Die erhaltenen Werte werden mit den Ergebnissen einer mRNA-Expressionsmessung der gleichen Proben verglichen. Die mRNA-Expressionsmessung wurde mittels RT-PCR durchgeführt [14].

Die analytische Einsatzmöglichkeit der Beads entsteht durch gebundene Fänger-moleküle. Um indivi-

duelle Testsysteme aufzubauen, können diese Fänger-moleküle an unbeschichtete Beads gekoppelt werden. Hierfür wurde das »Bio-Plex™ Amine Coupling Kit« der Firma Bio-Rad Laboratories verwendet. Die Kopplungsreaktion basiert auf einer zweistufigen Carbodiimid-Reaktion. Im ersten Schritt werden die Carboxylgruppen der Beads mit EDC aktiviert. Dabei fungiert NHS als Schutzgruppe. Im zweiten Schritt werden die NHS-Moleküle von den Fänger-molekülen verdrängt.

Die Kopplung wurde nach der Vorschrift des Kits durchgeführt. Pro Kopplungsansatz wurden 100 μ l Bio-Plex COOH-Beads ($1,25 \times 10^6$ Beads) verwendet.

Die gesamte Beadkopplung erfolgt bei Raumtemperatur. Die Inkubationsschritte müssen aufgrund der Lichtempfindlichkeit der fluoreszenzmarkierten Beads im Dunkeln stattfinden.

Zur Detektion von humanen IgG und IgM wurden Goat anti-Human IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg) bzw. Goat anti-Human IgM-Antikörper (Bethyl Laboratories, Inc., TX, USA) verwendet. Zum Nachweis von spezifischen anti-PP65-Antikörpern wurde rekombinantes PP65 aus *E. coli* (NatuTec GmbH, Frankfurt) verwendet.

Bei der Kopplung von Beads gehen durch Wasch- und Pipettierschritte zwangsläufig Beads verloren. Um die im Test zu verwendende Menge an Beads festzustellen, muss die Konzentration der Beads nach dem Kopplungsprozess in den einzelnen Kopplungsansätzen bestimmt werden. Die Bestimmung erfolgte mit dem Casy® 1 Model TT (Schärfe System GmbH, Reutlingen) und mit dem Bio-Plex 200 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Bei der Messung im Zellzähler wurden 9 μ l des Kopplungsansatzes mittels Vortexer homogenisiert, in 5 ml Casyton verdünnt und gemessen. Bei der Ermittlung der Beadkonzentration mit dem Bio-Plex 200 wurde ein Mikroliter der ebenfalls homogenisierten Kopplungsansätze in 124 μ l PBS verdünnt gemessen. Zur Zählung wurde der maximale »Beadcount« auf 10000 gesetzt und die Messzeitbegrenzung deaktiviert. Das Messvolumen wurde auf 100 μ l erhöht.

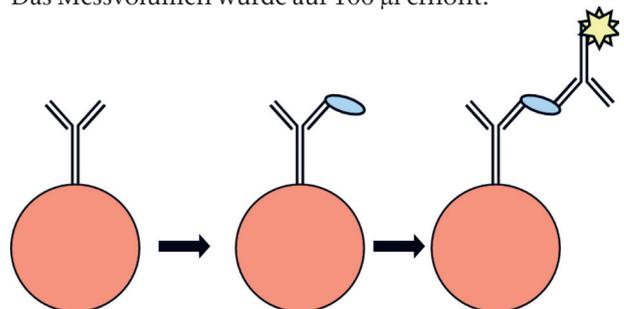


Abb. 2: Schema eines Sandwich-Assays; orange: Bead; blau: Analyt; gelb: Fluorophor

Verschiedene Bead-basierte Multiplex-Methoden wurden für den Bio-Plex 200 etabliert. Alle durchgeführten Versuche basierten hierbei auf dem Sandwich-Assay-Format (siehe Abb. 2).

Die mit Antikörpern, Antigen oder Nukleotidsequenzen funktionalisierten Beads wurden in einem ersten Schritt mit der Probe inkubiert. In einem zweiten Inkubationsschritt erfolgte die Reaktion mit einem Farbstoff-konjugierten sekundären Antikörper. Im Anschluss erfolgte die Messung mit dem Bio-Plex 200.

In einem Testansatz wurden pro Well 5000 Beads jeder Beadklasse mit 50 µl Positiv- oder Negativprobe für 1 h im Dunkeln auf dem Plattenschüttler inkubiert. Nach einem zweifachen Waschschrift wurden der oder die entsprechenden Detektionsantikörper zugegeben und wieder für 1 h im Dunkeln auf dem Plattenschüttler inkubiert. Ein weiterer zweifacher Waschschrift folgte. Wurde ein biotinylierter Antikörper verwendet, folgte ein halbstündiger Inkubationsschritt mit Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung. Nach einem letzten Waschschrift wurden zur Messung 125 µl PBS in jedes Well pipettiert und die Beads in einer fünfminütigen Inkubation auf dem Plattenschüttler in Lösung gebracht.

Zur Optimierung des Testsystems wurden die Konjugatmenge und die Konzentration der Oberflächenbeschichtung der Beads variiert, um ein optimiertes und stabiles Testsystem mit einem möglichst hohen Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Für die Bestimmung der Nachweisgrenzen des Testsystems wurde die Menge an positiver Kontrollprobe variiert.

Als Detektionsantikörper wurden Cy3-markierte Goat Anti-Human IgM- bzw. Goat Anti-Human IgG-Antikörper (beide Dianova, Hamburg) verwendet.

Für die Testung der Analyse-Methode wurden Proben aus einem humanen Referenzserum (Bethyl Laboratories, Inc., TX, USA), welches u. a. IgG und IgM enthält, mit unterschiedlichen Mengen an spezifischen anti-pp65-Antikörpern (Diagnostic Automation Inc, CA, USA) versetzt. Dabei wurden vier unterschiedlich konzentrierte pp65-Standardlösungen verwendet, die jeweils in kleinen Verdünnungsreihen eingesetzt wurden. Auf diese Weise wurden 16 Proben hergestellt, bei denen die Proben P1-P5, P6-P10, P11-P13 und P14-P16 einzelne Gruppen bilden.

Zur Etablierung einer weiteren Bead-basierten Technik unter Verwendung von Nukleotidsequenzen und zur gleichzeitigen Erweiterung des Testsystems sollten humane IgE mit einem DNA-Aptamer nachgewiesen werden. Das verwendete

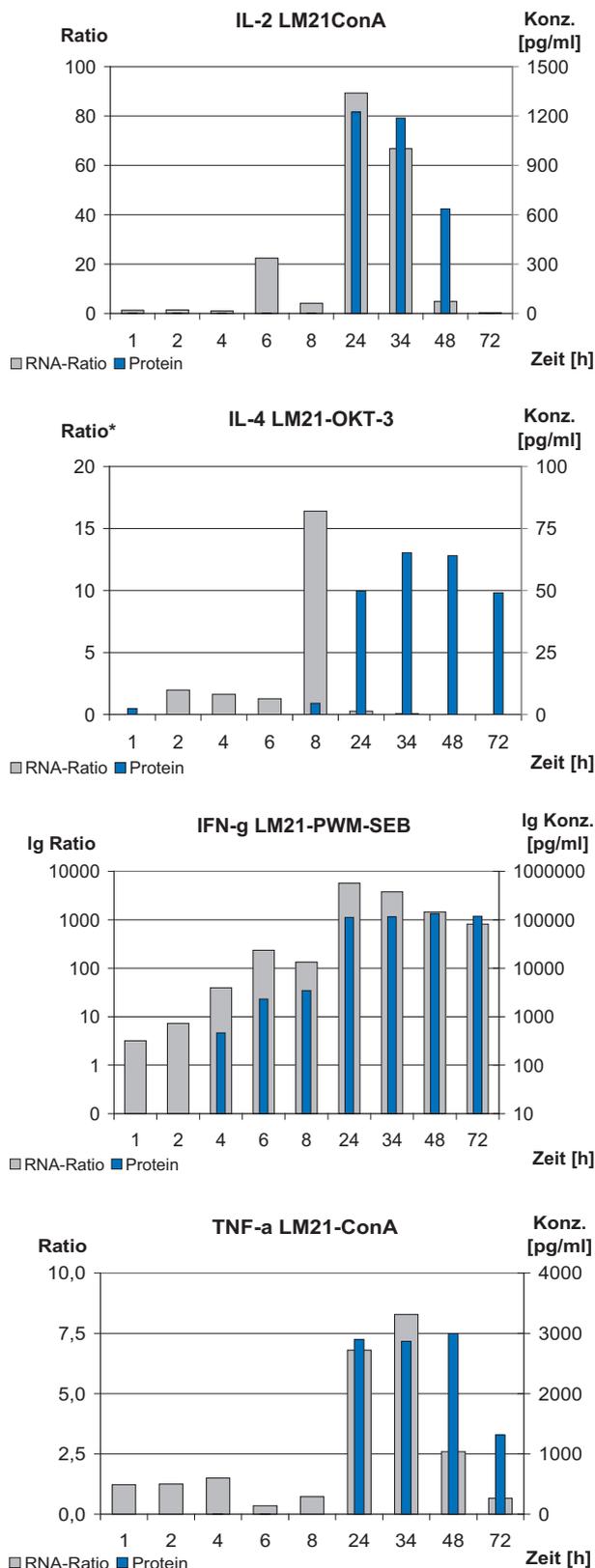


Abb. 3: Vergleich der RNA-Ratios der Zytokine IL-2, IL-4, IFN- γ und TNF- α mit den Ergebnissen des Bio-Plex Pro[™] Human Cytokine Assays. Die mit * gekennzeichneten Ratios konnten nicht normiert werden. Einige Konzentrationen und Ratios wurden zur besseren Darstellung logarithmiert.

Aptamer hatte die Sequenz 5'[Amine-C6] GGGGCACGTTTATCCGTCCCTCCTAGTGGCG TGCCCC3' (Sigma-Aldrich, Steinheim). Der Nachweis der DNA-Sequenz erfolgte mit einem biotinylierten Oligonukleotid [Biotin]5'GGGGCAGCCACTAG3' (Fisher Scientific GmbH, Schwerte). In einem Thermocycler (Mastercycler® Gradient, Eppendorf) wurden die Bead-gekoppelten DNA-Stränge hitzedenaturiert. Durch langsames Abkühlen wurde das biotinylierte Oligomer angelagert. Im Anschluss wurden die Beads mit Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung inkubiert und mit dem Bio-Plex 200 gemessen.

3 Ergebnisse

Die Quantifizierung der Zytokine in Kulturüberständen erfolgte mit einem Fertigsystem der Firma Bio-Rad. Anhand einer 8-stufigen Standardreihe konnten die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Messungen in Konzentrationen bestimmt werden.

Die zuvor gemessenen relativen RNA-Expressionswerte (*Ratios*) in Zellproben wurden anhand des Referenzgens »PBGD« (Porphobilinogendesaminase) normiert. Ein Vergleich der so erhaltenen Expressionswerte mit den quantifizierten Zytokinmengen in den gleichen Proben mit den Ergebnissen des Bio-Rad Testsystems ist in Abbildung 3 beispielhaft für jeweils nur einen Spender, einen Analyten und einen Wirkstoff dargestellt.

Bei dem von uns entwickelten System zum Nachweis humaner IgG, IgM und spezifischer anti-pp65 Antikörper wurde die optimale Menge an Fängermolekülen bestimmt. Diese beträgt für die anti-IgG und anti-IgM-Antikörper 10 µg/100µl Beadlösung und bei den pp65-Beads 34 µg/100µl BeadstammLösung. Die optimale Menge Detektionsantikörper wurde ebenfalls sowohl für die Cy3-markierten anti-IgG- als auch für die Cy3-markierten anti-IgM-Antikörper bestimmt. Des Weiteren konnten die unteren Nachweisgrenzen des Testsystems ermittelt werden. Diese betragen für den IgM-Nachweis 11 ng/ml und für den IgG-Nachweis 5 ng/ml (Ergebnisse nicht gezeigt).

Mit dem entwickelten Testsystem wurden u. a. die Proben P1-P16 gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt. Die Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Verdünnungsstufen ist deutlich zu erkennen.

Erste Experimente dienten zur Entwicklung eines Testsystems zum spezifischen Nachweis von humanen

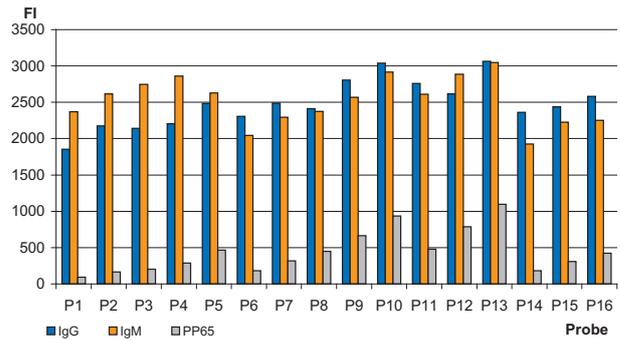


Abb. 4: Messung von Proben mit IgG- und IgM- und PP65-Beads. Alle Proben enthalten die gleiche Menge an humanem Referenzserum und verschiedene Konzentrationen an spezifischen anti-PP65-Antikörpern.

IgE mit einem DNA-Aptamer. In den durchgeführten Experimenten konnte jedoch bisher keine spezifische Bindung von IgE-Molekülen nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zum Nachweis der DNA-Kopplung an die Beads mit einer künstlich synthetisierten Nukleotidsequenz, die sich an das 3'-Ende der offenen Aptamersequenz bindet, wurden die Beads auf 75° C erhitzt und zusammen mit der komplementären DNA (*Oligomer*) wieder langsam auf 35° C abgekühlt. Anschließend erfolgten die Konjugation des gebundenen biotinylierten Oligomer mit Streptavidin-Phycoerythrin und die Messung mit dem Bio-Plex. Zum Vergleich wurden gleichermaßen erhitze Beads ohne Oligomerzugabe mit Streptavidin-Phycoerythrin inkubiert und gemessen. Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse beider Versuchsreihen. Auch hier lässt sich ein konzentrationsabhängiger Signalverlauf erkennen.

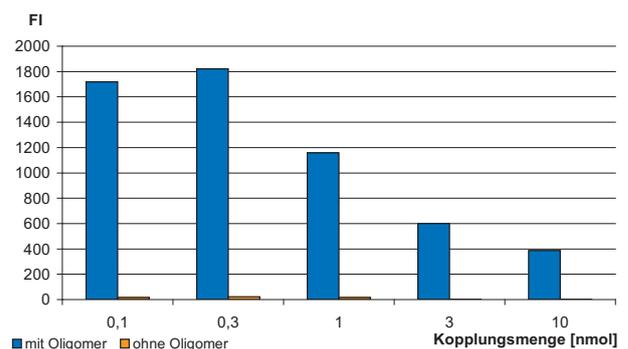


Abb. 5: Überprüfung der Aptamerkopplung mit Oligomeren. Mit zunehmender Kopplungsmenge nimmt die Signalstärke ab.

4 Diskussion

Unsere Messungen zeigen, dass die Zytokinkonzentrationen zu Beginn der Kultivierung sehr gering sind und je nach Behandlung ab der 4. Stunde, meist aber erst nach 24 Stunden, deutlich ansteigen. Signifikante Zytokin-

konzentrationen lassen sich erst nach oder frühestens mit einer erhöhten mRNA-Expression nachweisen. Die Änderung der mRNA-Expression ist in den meisten Fällen entweder gering und erfolgt über einen größeren Zeitraum oder nur zu einem oder wenigen Messpunkten, dann aber sehr stark. Die Konzentration der sekretierten Zytokine erreicht ein Maximum und bleibt auf diesem Niveau oder fällt unterschiedlich schnell wieder ab. Zwischen dem Ausmaß der RNA-Expressionsänderung und der Höhe der Proteinkonzentration kann ein Zusammenhang hergestellt werden. Zum Beispiel führt eine um mehr als 10.000fach gesteigerte mRNA-Expression zu IFN- γ Konzentrationen von mehr als 100 ng/ml. Im Gegensatz dazu ist die Expression des IL-4-Gens nicht sehr stark erhöht und es werden nur geringe IL-4-Konzentrationen im Bereich von 10–100 pg/ml gemessen. Genauere Schlussfolgerungen der dargestellten Zusammenhänge erfordern spezielle Kenntnisse in verschiedenen Bereichen der Zellkultur und der Zellregulation, auf die hier nicht eingegangen werden kann. Eine präzisere Aussage über den Verlauf der Zytokinbildung könnte durch kürzere Abstände zwischen den Probenentnahmen, insbesondere zwischen der 8. und 24. Stunde, getroffen werden.

Die Einsatzfähigkeit des entwickelten Testsystems zur Analyse von Proben auf Antikörper-Gehalt im multiplexen Ansatz konnte mit der Messung der Proben P1-P16 gezeigt werden.

In der dargestellten Messung (Abb. 4) lässt sich bei den pp65-Beads gut die konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensitäten beobachten. Auch das Signal der IgG- und IgM-Messung zeigt unterschiedliche Messwerte, obwohl in allen Proben die gleiche Menge an Referenzserum enthalten ist. Demnach werden die Antikörper der zugesetzten pp65-Positivkontrollen sowohl von den pp65-Beads als auch von den IgG- und IgM-Beads gebunden.

Da die anti-pp65-Antikörper entsprechend ihres Isotyps auch von den IgG- und IgM-Beads gebunden werden, ist eine genaue Bestimmung der einzelnen Konzentrationen der Antikörper jedoch nur in getrennten Ansätzen möglich.

Die einzelnen Gruppen zeichnen sich durch unterschiedlich hohe Fluoreszenzwerte der IgG oder der IgM aus. Dies kommt durch die unterschiedlich hohen Konzentrationen an IgG und IgM in den PP65-Positivkontrollen zustande.

Der spezifische Nachweis von IgE mit Aptamergekoppelten Beads war im gewählten experimentellen

Setup nicht möglich. Ein möglicher Grund ist die Ausbildung einer falschen oder gar keiner Aptamerstruktur. Es konnte jedoch die erfolgreiche Kopplung der Nukleotidsequenz nachgewiesen werden. Mit zunehmender Kopplungsmenge nimmt die Signalstärke ab. Die maximale Fluoreszenzintensität wird bei einer Kopplungsmenge von 0,3 nmol erreicht. Die Beads wurden sowohl mit als auch ohne Oligomer erhitzt und anschließend mit Streptavidin-Phycoerythrin inkubiert. Eine unspezifische Bindung des Streptavidin-Phycoerythrin an die Beads konnte ausgeschlossen werden.

Die Abnahme der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Kopplungskonzentration entsteht durch die dichte Packung der DNA-Stränge an der Oberfläche der Beads, sodass die Interaktion der Oligomere mit den Zielsträngen sterisch gehindert wird. Zudem erzeugen die DNA-Stränge aufgrund der negativen Phosphatreste im Rückgrat der DNA hohe negative Ladungen. Bei höheren Oberflächenkonzentrationen auf der Beadoberfläche können diese nicht mehr durch den verwendeten Puffer ausgeglichen werden. Die Bindung von Oligomer und Zielstrang wird aufgrund der polaren Abstoßungskräfte vermindert.

Mit diesem Versuch konnten zugleich die Anwendbarkeit der Beads in möglichen Versuchen zum Nachweis von Nukleotidsequenzen sowie die Temperaturstabilität der Beads gezeigt werden.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die verschiedenen untersuchten Bead-basierten Multiplexmethoden zeigen die vielfältige Anwendbarkeit des Suspensions-Array-Systems. Bei der Entwicklung des Testsystems zur Detektion von humanen IgG und IgM konnte neben der hohen Messgenauigkeit des Messsystems, die Robustheit, die hohe Sensitivität und der große Messbereich von Nachweisen mit der Bead-basierten Methode gezeigt werden. Die Vielseitigkeit der Messmethode sollte mit der Etablierung eines Testsystems zum Nachweis von humanen IgE durch Aptamer-gekoppelte Beads gezeigt werden. Hier gibt es jedoch eine große Anzahl von Einflussfaktoren, die weitere Untersuchungen erfordern.

Die in diesem Zusammenhang gezeigte Verwendbarkeit der Beads in Bindungsexperimenten mit Nukleotidsequenzen, kann für eine Vielzahl möglicher Untersuchungen eingesetzt werden.

Quellen

- [1] Probst, M. C. O.; Kroder, M. J. (2007) in Sack, U.; Tárnok, A.; Rothe, G.: Zelluläre Diagnostik, S. Karger Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Freiburg, Kapitel I, Technische und methodische Grundlagen, Abschnitt Bead-basierte Multiplexanalytik, S. 191-207.
- [2] Bellisario, R.; Colinas, R. J.; Pass, K. A. (2000): Simultaneous measurement of thyroxine and thyrothrin from newborn dried blood-spot specimens using a multiplexed fluorescent microsphere immunoassay, *Clinical Chemistry*, 2000; 46, 1422-1424.
- [3] http://www.panomics.com/images/96_2_LASER_2_V1.jpg, 08.08.2009.
- [4] Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. (1997): *Molekularbiologie der Zelle*, VCH, Weinheim, 3. Auflage 1997, Kapitel 23 Immunsystem.
- [5] Schütt, C.; Bröker, B. (2006): *Grundwissen Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, München, 2006, 1. Auflage.
- [6] Thomson, A. W.; Lotze, M. T. (2003): *The Cytokine Handbook Volume 1*, Academic Press, San Diego, Fourth Edition 2003, Chapter 1 Introduction, S. 40-56.
- [7] Torres-Chavolla, E.; Alocilja, E. C. (2009): Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens, *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(11), 3175-3182.
- [8] <http://de.wikipedia.org/wiki/Aptamer>, 23.06.2009.
- [9] http://dgk.de/fileadmin/user_upload/Gesundheit-pdf/Inhalt_Cytomegalie.pdf, 15.04.09.
- [10] Ley-Köllstadt, S. (2009): Cytomegalie & Co: Häufige Virusinfektionen in der Schwangerschaft, http://dgk.de/fileadmin/user_upload/Gesundheit-pdf/cytomegalie_brosch_web_08.pdf, 15.04.2009.
- [11] <http://www.icon-cmv.de/>, 15.04.2009.
- [12] http://www.medlabor-wm.de/index.php?option=com_content&task=view&id=192&Itemid=62, 15.04.2009.
- [13] Rioux, J. D.; Ohlin, M.; Borrebaeck, C. A. K.; Newkirk, M. M. (1995): Molecular Characterization of Human Monoclonal Antibodies specific for the Human Cytomegalovirus: Relationship of Variable Region sequence to Antigen Specificity and rheumatoid factor-associated Idiotype Expression, *Immunology and Infectious Diseases*, Vol 5, 1995, 43-52.
- [14] Lopez-Hemmerling, D. (2008): RT-PCR Expressionsprofile humaner Leukozyten unter verschiedenen Kulturbedingungen, Masterarbeit an der TFH Wildau.

Die wesentlichen Experimente wurden im Rahmen der Masterarbeit des Erstautors im Labor für Molekularbiologie und Funktionelle Genomik der Technischen Hochschule Wildau [FH] durchgeführt.

Wir danken der Fa. ProBioGen AG Berlin für ihre Unterstützung.

Autoren

Lars Radke, MSc.

TH Wildau [FH]

Biosystemtechnik/Bioinformatik

Diana Lopez Hemmerling, MSc.

TH Wildau [FH]

Biosystemtechnik/Bioinformatik

Labor für Molekularbiologie und Funktionelle Genomik

diana.lopez@tfh-wildau.de

Dr. Christoph Giese

Director Cell and Tissue Services and Quality Control

ProBioGen AG, Berlin

Goethestrasse 54, 13086 Berlin

Tel. +49 30 924006-0

Dipl.-Ing. Annika Lubitz

Cell And Tissue Services

ProBioGen AG, Berlin

Goethestrasse 54, 13086 Berlin

Tel. +49 30 924006-0

Prof. Dr. Franz-Xaver Wildenauer

TH Wildau [FH]

Tel. +49 3375 508-148

franz.wildenauer@tfh-wildau.de

Prof. Dr. Marcus Frohme (korrespondierender Autor)

TH Wildau [FH]

Labor für Molekularbiologie und Funktionelle Genomik

Tel. +49 3375 508-249

marcus.frohme@tfh-wildau.de