

CHARAKTERISIERUNG VON PROTEIN A-SPEZIFISCHEN DNA-APTAMEREN MITTELS SPR

V. Tröger¹, B. Strehlitz², R. Stoltenburg², S. Schmieder³, F. Sonntag³

¹Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI, Leipzig, Deutschland

²Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung UFZ, Leipzig

³Fraunhofer-Institut für Werkstoff- und Strahltechnik IWS, Dresden, Deutschland

EINFÜHRUNG

Aptamere sind synthetische Nukleinsäureliganden, die über ihre 3D-Struktur mit hoher Affinität und Spezifität Aminosäuren, Pharmaka, Proteine und andere Moleküle binden können [1]. Mit Hilfe des SELEX-Prozesses können Aptamere gezielt für ein bestimmtes Target selektiert werden. Die SPR bietet sich hierbei zur Überwachung eines Aptamerselektionsprozesses unter anderem durch ihre einfache Handhabung sowie der Möglichkeit zu labelfreien Echtzeitmessungen an [2]. Am UFZ in Leipzig konnte mit der FluMag-SELEX-Methode [3] ein neues DNA-Aptamer (PA#2/8) für Protein A selektiert werden [4]. Die Bindungseigenschaften hinsichtlich Affinität und Spezifität des Aptamers zu seinem Target wurden am UFZ umfangreich untersucht (Publikation in Vorbereitung). Es eignet sich daher sehr gut als Modellsystem für aptamer-basierte Anwendungen des etablierten ¹SPR-Messsystems [5-7].

MATERIAL UND METHODEN

Das Fraunhofer SPR-System besteht aus einem Spektrometer mit dazugehöriger Software, einem Probenhandlingsystem sowie einem lab-on-chip-System, zusammengesetzt aus einer temperierbaren on-chip-Mikrofluidik und dem entsprechenden Sensorchip (Abb. 1 links). Die SPR-Chips sind spritzgegossene Cyclo-Olefin-Copolymer-Substrate (TOPAS®) mit Goldbeschichtung im Glasobjektträgerformat (76 x 26 x 4 mm³). Mittels Spotten können bis zu 180 Messflächen auf der Chipoberfläche realisiert werden [8]. Die integrierten optischen Linsenelemente bieten eine justage-unkritische Kopplung zum Auslesegerät. Das Auslesesystem bietet die winkelaufgelöste, quasi-monochromatische Messung und zeitaufgelöste Beobachtung von Bindungskinetiken sowie die semiparallele Auswertung durch die sequentielle Analyse dreier, nebeneinander liegender Positionen auf dem Chip. Zum Spotten von SPR-Chips wurde der Nanoplotter NP2.1™ (GeSiM) verwendet (Abb. 1 rechts). Dieses universelle Mikropipettiersystem verfügt über mikrotechnisch gefertigte piezoelektrische Pipetten die nach dem *Drop-on-Demand*-Verfahren simultan und individuell dosieren können. Damit ist die präzise und reproduzierbare Immobilisierung von winzigen Spots auf beliebigen Oberflächen möglich. Je nach Pipette beträgt das Volumen einzelner Tropfen entweder ca. 0,1 nl oder 0,4 nl. Die Arbeitsfläche bietet Platz für eine Ablage von bis zu 55 SPR-Chips.



ABB. 1: links: Fraunhofer SPR-Messgerät mit on-chip-Mikrofluidik und SPR-Chip im Vordergrund; rechts: Berührungsfreie Funktionalisierung eines SPR-Chips mit dem Nanoplotter™.

Die Sensorchips wurden mit Streptavidin überschichtet und anschließend mittels Nanoplotter™ mit 3'-biotinyliertem Aptamer PA#2/8 und als Referenz ohne Affinität zu Protein A mit 3'-biotinylierter SELEX-Bibliothek BANK-C gespottet. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde daraufhin die gesamte Oberfläche mit HSA für 30 Minuten geblockt. Die Wechselwirkungen des immobilisierten Aptamers bzw. der BANK-C mit rekombinanten Protein A verschiedener Konzentrationen wurde mittels SPR gemessen. Zwischen den einzelnen Injektionen erwies sich eine Regenerationslösung aus 1 M NaCl zur Spaltung des Aptamer-Protein-A-Bindungskomplexes als geeignet.

ERGEBNISSE

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze und der Aufnahme konzentrationsabhängiger Messreihen wurden Protein A-Konzentrationen von 100 bis 10000 nM injiziert (Abb. 2 links). Die Nachweisgrenze lag bei 100 nM, das Detektionsmaximum bei 10000 nM Protein A.

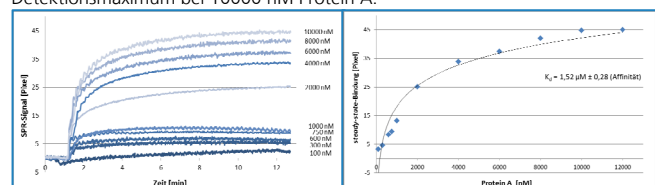


ABB. 2: links: Sensorgramm der Protein A-Konzentrationsreihe auf 20 µM PA#2/8 funktionalisierten Messflächen; rechts: Sättigungskurve des PA#2/8-Aptamers

Aus den Bindungssignalen der Protein A-Konzentrationen wurde eine Sättigungskurve erstellt (Abb. 2 rechts). Für das rekombinante Protein A wurde eine *steady-state*-Affinität von 1,52 µM ermittelt. Um die Spezifität des Aptamers PA#2/8 zu untersuchen, wurden Protein G, BSA, Casein und humanes Thrombin in einer Konzentration von 1000 nM als Negativkontrollen verwendet. Das Aptamer PA#2/8 kann eindeutig zwischen Protein A als seinem spezifischen Target und dem ebenfalls IgG-bindenden Protein G unterscheiden (Abb. 3). Eine unspezifische Bindung an den Negativkontrollen konnte nicht beobachtet werden.

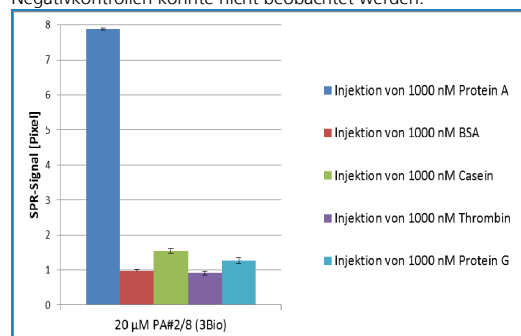


ABB. 3: Untersuchung der Spezifität des Aptamers PA#2/8

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Charakterisierung des Protein A-spezifischen Aptamers PA#2/8 konnte erfolgreich ein Protokoll zur Funktionalisierung durch *non-contact-printing* mittels Nanoplotter™ für SPR-Messungen entwickelt und etabliert werden. Für die Detektion von Protein A wurde eine Nachweisgrenze von 100 nM ermittelt. Das Detektionsmaximum für Protein A lag bei 100 µM. Des Weiteren konnte durch Spezifitätsuntersuchungen gezeigt werden, dass das Aptamer PA#2/8 zwischen eng verwandten Targets unterscheidet. Diese Ergebnisse zeigen eine konzentrationsabhängige Bindung des Aptamers PA#2/8 und bestätigen eindeutig dessen Spezifität; und sind in diesem Zusammenhang vergleichbar mit den Resultaten am UFZ, welche am Biacore X100 durchgeführt wurden.

LITERATUR

- [1] E. Luzzi et al. (2003), TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22: 810-818.
- [2] J. Homola (2003), Analytical and bioanalytical chemistry, 377: 528-539.
- [3] R. Stoltenburg et. al. (2005), Anal. Bioanal. Chem., 383: 83-91.
- [4] R. Stoltenburg, B. Strehlitz, DE 102011006610.1 (31.03.2011), PCT/EP2012/055655 (29.03.2012).
- [5] V. Tröger et. al. (2012), 46. DGBMT Jahrestagung 2012, In Proceedings.
- [7] A. Henseleit, A. et. al. (2011), Eng. Life Sci. 11, 1: 573-579.
- [8] M. Mertig et. al. (2009), Proceedings of IEEE SENSORS Conference, Christchurch, New Zealand 2009, 392-395.

