

bioanalytik



Supernova im Reagenzglas

Nanokristalle für
Mega-Fluoreszenzverstärkung

Prof. Dr. Reinhard Renneberg¹, Jan Engels¹, Dr. Hans-Georg Eisenwiener²

¹ Hong Kong University of Science and Technology (HKUST), Hongkong, China

² Diagnostic Healthcare Consulting, Weil am Rhein, Germany



SICOLAB

Die Kompressorstation für das Labor

Mobil und wartungsfrei liefert SICOLAB dank kompakter Maße direkt am Arbeitsplatz ölfreie Druckluft z. B. für:

- Analysen
- Laborautomation
- Chromatographie
- Spektroskopie
- LCMS
- Probenentnahme

Besuchen Sie uns
auf der ILMAC, in
Halle 1.2, Stand E24

Weitere Infos unter: www.duerr-technik.com



Dürr Technik GmbH & Co. KG · Pleidelsheimer Straße 30
D-74321 Bietigheim-Bissingen · Tel: +49 (0)71 42/90 22-0

Es wird die spannende Geschichte davon erzählt, wie es zur Erfindung einer Mega-Fluoreszenzverstärkung kam. Am Anfang stand die Frage: Wie kann man bisherige biochemische Nachweisreaktionen millionenfach verstärken, um dadurch biochemische „Nadeln im Heuhaufen“ (Substanzen in äußerst geringen Konzentrationen) in einem Vielkomponentensystem wie z. B. einer Blutprobe zu detektieren?

Eine Mega-Idee lieferte eine mögliche Lösung, die auf folgenden Gedanken basiert: Wird ein Nanokristall, bestehend aus Millionen von potenziell fluoreszierenden Molekülen, anstelle eines oder einiger weniger singulärer fluoreszierender Moleküle als Label („Marker“) bei immunochemischen Antigen-Antikörpertests oder bei Hybridisierungsreaktionen (DNA-Tests) eingesetzt, so kann es rechnerisch zu einer potenziellen, millionenfach stärkeren Fluoreszenz und damit Verstärkung kommen. Wenn ein solcher Nanokristall schnell in Lösung gebracht und dann durch eine chemische Reaktion – eine Hydrolyse – zur Fluoreszenz getriggert wird, kommt es schlagartig zur Fluoreszenz von Millionen potenziell fluoreszierender Moleküle. Dies kann mit einer „Supernovaexplosion im All“ verglichen werden. Als fluoreszierendes Molekül wurde Fluoresceindiacetat (FDA), ein nicht fluoreszierendes organisches Molekül, das nach der Hydrolyse fluoresziert, gefunden und ausgewählt.

Das immer wieder auftretende Problem: mangelnde Nachweis- und Quantifizierbarkeit einer Substanz in einer komplexen Probenmatrix

Wo braucht man hochempfindliche Nachweisreagenzien?

Der Nachweis eines Analyten in Blut, Serum/Plasma, Urin, CSF oder Speichel kann sehr „mühsam und stressig“ oder bislang überhaupt nicht möglich sein – vor allem dann, wenn DNA, Antigene, Antikörper oder andere Stoffe nachgewiesen werden sollen, die in nur sehr geringen Konzentrationen (z. B. im Nano-, Pico- oder Femtogramm/mL-Bereich) vorliegen oder wenn es schwierig oder schmerzvoll ist, größere Mengen an Probenmaterial zu bekommen.

Mit heutigen Bestimmungsverfahren – unter Einsatz von kolloidalem Gold oder

klassischen Fluoreszenzmarkern – ist es möglich, beim Einsatz von 50–100 µL Kapillarblut die kardialen Marker wie Troponin I/T, FABP oder BNP/NT-proBNP qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Aber wie bekommt man 50–100 µL Kapillarblut aus der Fingerbeere? Dies ist nicht schmerzlos. Bei Einsatz des Super-Labels FDA als Nanokristall reichen 5–10 µL Blut. Diese Menge an Blut ist problemlos zu erhalten.

Heureka im Nachtlabor

Die FDA-Story

Im Jahre 1999/2000 arbeitete Dieter Trau, derzeit Professor an der National University Singapore (NUS), an seiner Doktorarbeit an der Hong Kong University of Science and Technology (HKUST) im Labor von Prof. Dr. Renneberg. Sein Forschungsbereich war die Layer-by-Layer-Einkapselung von verschiedenen Enzymen und Mikromolekülen mithilfe von Polyelektrolyten. Hierbei verwendete er unter anderem auch den organischen Stoff Fluoresceindiacetat (FDA), der kommerziell in kristalliner Form vorliegt.



bioanalytik

Als Dieter Trau das Polyelektrolyt-Labeling von großen FDA-Kristallen gelang, kam ihm eine Idee, wie er seine bisherigen Experimente direkt weiter nutzen könnte: „Wieso nicht einen fluoreszierenden Kristall für einen Fluoreszenznachweis anstelle der üblichen Nachweismethoden verwenden, bei denen nur wenige fluoreszierende Moleküle pro Antikörper binden?“

Dieter Trau labelte also klein gemahlene FDA-Kristalle zuerst mit Polyelektrolytschichten aus PAH (Polyallylamin-Hydrochlorid) und PSS (Polystyrensulfonat). Anschließend heftete er an diese Antikörper, um einen Immuntest auszuprobieren. Nach verschiedenen Tests und Experimenten gelang es ihm, erfolgreich einen FDA-Kristall zuerst mit Antikörpern zu labeln und anschließend Antigene zu binden. Zur Erzeugung des Signals fehlte aber letztendlich die Reaktion von nicht fluoreszierendem FDA zu stark fluoreszierendem Fluorescein. Hierfür nutzte Trau zuallererst Enzyme (Esterasen), die auch in der Zellkultivierung verwendet werden. Diese führen die Reaktion jedoch nur relativ langsam durch, was den Effekt der starken Fluoreszenz wieder abschwächte. Weitere Versuche führten zur Hydrolyse der Acetatgruppen durch hochkonzentriertes Natriumhydroxid (NaOH) zu Essigsäure und Uranin (Abb. 1).

FDA ist jedoch eine organische Verbindung. Sie ist nicht gut wasserlöslich, aber sehr gut in organischen Lösungsmitteln wie DMSO oder IPA (Isopropanol-Alkohol) löslich. Mit Zugabe eines „Releasing Reagens“, bestehend aus z. B. DMSO und Natriumhydroxid, „explodierten“ die Kristalle wie bei einer Supernova und die komplette Flüssigkeit verfärbte sich schlagartig in eine stark grün fluoreszierende Lösung, die mit bloßem Auge zu erkennen ist (Abb. 2). Grundlage für die „Supernova-Fluoreszenz“ ist das sofortige Auflösen des Kristalls, was dann die schnelle chemische Reaktion zwischen der Natronlauge und dem FDA ermöglicht. Prof. Renneberg rief begeistert „Super“ und Dieter Trau ergänzte mit „und Neu ist nova“. So kam die Idee zu einem Namen – „SuperNova“ – und wurde kurze Zeit später auch patentiert [1].

„Wundersubstanz“ FDA

Die Voraussetzungen: Es sollte eine Verbindung sein, die kristallin vorliegt, gut spezifiziert ist und als solche nicht fluoresziert. Der Kristall muss sich auf Nanometergröße

klein mahlen oder umkristallisieren lassen. Warum aber ausgerechnet Kristalle? Sie behalten die dichteste Packung von Molekülen in der gesamten Natur. Nachdem der Kristall durch eine „Reaktionsmischung“ aufgelöst wurde, reagierten die gelösten Moleküle schlagartig weiter und alle gelösten Moleküle fluoreszierten. Dieter Trau gelang so in Hongkong erstmalig die Entdeckung von Fluoresceindiacetat (FDA) als Mega-Fluoreszenzverstärker [2].

Fluoresceindiacetat (FDA) ist ein Derivat des bekannten fluoreszierenden Moleküls Fluorescein, das oft in Immunoassays verwendet wird. Die beiden Stoffe unterscheiden sich molekular durch zwei Acetat-

gruppen, die dem FDA angehängt sind. FDA selbst hat fast keine eigene Fluoreszenz und wird vorwiegend im Bereich der Bakterien- oder Zellkultivierung eingesetzt. Hierbei reagiert FDA mit hydrolysekatalysierenden Enzymen (speziell Esterasen) zu Fluorescein, indem die beiden Acetatgruppen abgespalten werden. Dies spiegelt sich in einer intensiven grünlichen Färbung und Fluoreszenz wider, die sich mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops gut in den lebenden Zellen erkennen lässt. Mit dieser Reaktion kann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden, da abgestorbene Zellen keine Enzyme mehr produzieren.

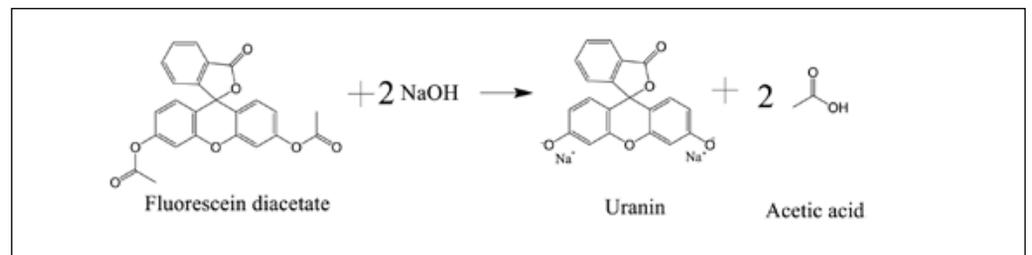


Abb. 1 Hydrolysereaktion von Fluoresceindiacetat (FDA) mit Natronlauge zum grün fluoreszierenden Uranin sowie Essigsäure als Nebenprodukt.

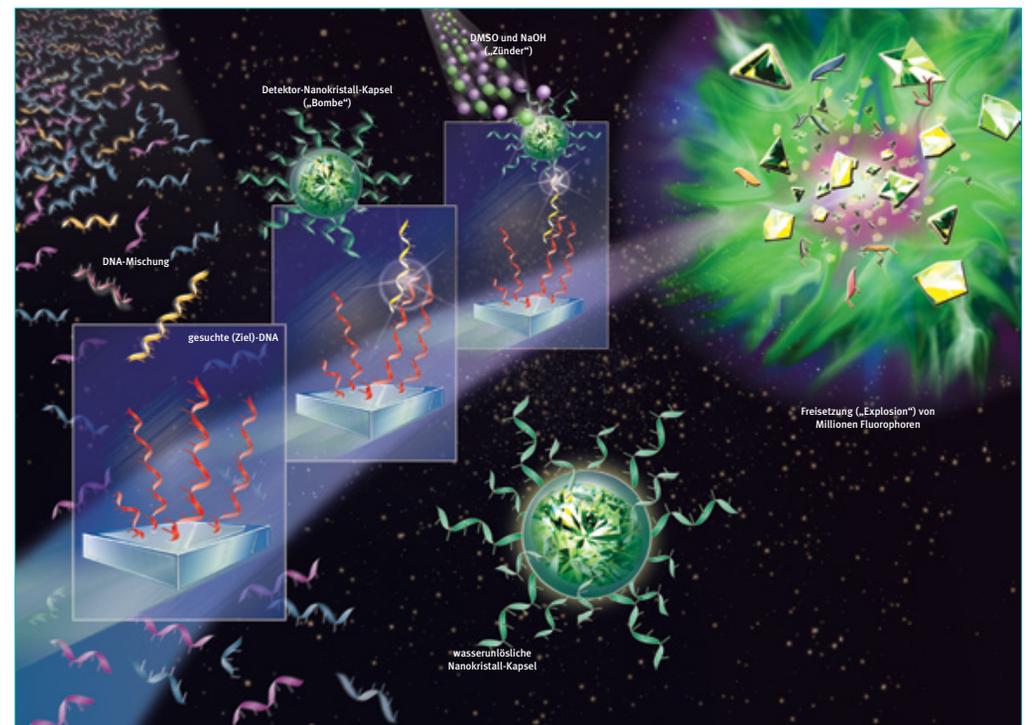


Abb. 2 Grafische Abbildung zur Veranschaulichung des Supernova-Prinzips, hier zum Nachweis von DNA: Zuerst kommt es zur Bindung von Fänger-DNA-Strängen an eine spezifische Oberfläche. Im nächsten Schritt bindet die gesuchte komplementäre DNA an den Fänger. Die nicht fluoreszierenden Nanokristalle wurden mit ergänzender Nachweis-DNA markiert und binden anschließend ebenso an den gefangenen DNA-Strang. Zuletzt wird das erforderliche Gemisch aus organischem Lösungsmittel (DMSO) sowie Reaktionsreagenz (NaOH) hinzugegeben. Der Kristall wird schlagartig aufgelöst und die vorerst nicht fluoreszierenden Moleküle fangen nach einer Folgereaktion an, grün zu strahlen.

Illustration: Biotechnologie für Einsteiger, 4. Auflage



Sicherheit durch
Containment

SKAN AG
Binningerstrasse 116
4123 Allschwil
Schweiz
T +41 61 485 44 44
F +41 61 485 44 45
info@skan.ch
www.skan.ch

Die Luft kontrolliert eingesetzt

Skanair® Workstation^{evo}

Der sparsame Sicherheitsabzug mit Filter-System und vollem Personenschutz

ILMAC

24 – 27 September 2013
Messe Basel, Halle 1.1, Stand C91

Gemeinsam immer einen Schritt voraus



bioanalytik



Reinhard Renneberg, geb. 1951, studierte Chemie an der Lomonossov-Universität, Moskau. Nach dem Diplom ging er an das Zentralinstitut für Molekularbiologie (ZIM) in Berlin-Buch, wo er 1978 promovierte und sich 1991 auf dem Gebiet der Biosensorik habilitierte. Von 1991 bis 1995 leitete er die Abteilung Immunsensorik des Fraunhofer-Instituts für Chemo- und Biosensorik (ICB), Münster. 1994 folgte er dem Ruf der Hong Kong University of Science and Technology (HKUST) als Full Professor of Analytical Biotechnology. Renneberg ist darüber hinaus als Firmengründer aktiv. Er ist Autor der „Bioanalytik für Einsteiger“ sowie „Biotechnologie für Einsteiger“, für die er 2008 den Literaturpreis des Fonds der Chemischen Industrie erhielt.

Foto: © Viola Berkling, Oschersleben



Jan Engels, geb. 1989, studierte Biotechnologie an der FH Aachen. Nach seinem Bachelor wurde er von Prof. Reinhard Renneberg für das Fast-Track-Programm der Hong Kong University of Science and Technology (HKUST) für einen direkt anschließenden PhD in Chemie vorgeschlagen und angenommen. Sein Interessengebiet sind Nanopartikel für den Nachweis verschiedener Reagenzien sowie deren direkte Anwendung. Aktuell forscht er an FDA-Nanokristallen für verschiedene Immunoassays. Des Weiteren ist er aufgrund seines wirtschaftlichen Interesses aktiv in der Gründung eines Start-Up-Unternehmens, das aus der Forschungsgruppe von Prof. Renneberg hervorgeht.



Hans-Georg Eisenwiener, geb. 1939, studierte physikalische Chemie an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz. Nach seiner Doktorarbeit beschäftigte er sich mehr mit der medizinischen Diagnostik und übernahm dann die Leitung des neurologischen Labors der Neurologischen Universitätsklinik in Göttingen, bevor er in die damals sich im Aufbau befindliche Diagnostiksparte von F. Hoffmann-La Roche in Basel eintrat. Hier war er für die F&E-Abteilung der Diagnostiksparte mit der breiten Produktpalette aus klinischer Chemie, Immunochemie, Mikrobiologie, Blutgerinnung und Analysenautomation zuständig. Nach einer Reorganisation suchte er extern nach neuen diagnostischen Parametern und Bestimmungsmethoden. Seit seiner Pensionierung ist er als Berater tätig für die Einführung und Kommerzialisierung neuer diagnostischer Parameter und Point-of-Care-Technologien.

Enormes Verstärkungspotenzial

Eine einzige, 100 nm große FDA-Kristallkugel fasst sagenhafte 1.200.000 (1,2 Mio.) FDA-Moleküle. Bedenkt man nun, dass den rund 1,2 Mio. Molekülen im verwendeten Kristall bis zu zehn Moleküle gegenüberstehen, die direkt an Antikörper gebunden sind, so kommt es zu einem Verhältnis von 1:120.000. Dies spiegelt sich natürlich auch in der Fluoreszenzstärke wider.

Kernfrage: Wie kann man ein besseres oder stärkeres Signal oder – genauer gesagt – ein höheres Signal/Noise-Verhältnis erzeugen? Wäre es nicht besser, anstelle von wenigen fluoreszierenden Molekülen von z. B. FITC einen Nanokristall von Millionen von FDA-Molekülen einzusetzen, um die analytische Sensitivität, charakterisiert durch die 3 NCCLS-Parameter – Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze und Quantifizierungsgrenze – in den ng/pg- bis fg-Bereich für

geringe zur Verfügung stehende Probenmengen zu bringen?

Im Unterschied zu heutigen „State-of-the-art“-Vorgehen ist dies möglich, indem nicht nur Moleküle von Fluoreszenz-Labels an Antigene, Antikörper oder DNA gebunden werden, sondern Nanokristalle von fluoreszierenden Molekülen gebunden werden. Das heißt: Anstelle von etwa zehn fluoreszierenden Molekülen, die kovalent an Antikörper gebunden werden, kommt es bei der umgekehrten Bindungsfolge zur Verwendung eines kompletten Kristalls, bestehend aus einem Derivat eines fluoreszierenden Moleküls, an das die Antikörper direkt gebunden werden. Diese Bindung zwischen Kristall und Antigen oder Antikörper kann adsorptiven oder kovalenten Ursprungs sein. Die Bindungsstärke kann noch durch eine Vorbeschichtung des Kristalls mit geladenen Polyelektrolytschichten,

die so genannte Layer-by-Layer-Verkapselung, erhöht werden [3].

Die große Herausforderung: Konkurrenz für die PCR?

Neben der Optimierung der Partikelgröße wird des Weiteren an der Entwicklung von Immunoassays für verschiedene Antigene und Antikörper gearbeitet, die eine geringere Nachweisgrenze als handelsübliche Assays haben [4]. Noch attraktiver wäre aber ein direkter Nachweis von nur wenigen DNA-Molekülen. Konkurrenzloser Standard ist derzeit – neben mehreren anderen Amplifikationsverfahren – die Polymerasekettenreaktion, mit der man etwa 1 Mio. DNA-Kopien in einer Stunde erhält.

Wie nahe käme man mit der AmpCrystal (SuperNova)-Methode in den Bereich der DNA-PCR-Amplifikation? Wie viel DNA-

Moleküle wären erforderlich, um diese zu detektieren? Was wäre mit SuperNova ohne Cyclor und teure Enzyme möglich?

Das Vorgehen: Es wird ein Nanokristall nicht mit Antikörpern, sondern mit DNA-Einzelsträngen beschichtet. Diese binden an komplementäre DNA aus der Probe, die im ersten Schritt an eine Fänger-DNA gebunden wird. Nach der Zugabe des Releasing Reagens und damit verbundener Mega-Fluoreszenzenerzeugung kann diese nachgewiesen werden [5]. Man könnte die AmpCrystal-Methode auch mit PCR kombinieren und dadurch Zyklen einsparen – oder aber die PCR bei einigen Tests (z. B. in der Mikrobiologie) ersetzen.

→ chrenneb@aust.hk

→ jfengels@aust.hk

→ info@eiconnet.de

Literatur

- [1] Dieter T. et al. (2004) *US* 20040014073
 - [2] Dieter T. et al. (2002) *Anal. Chem.* 202, 74, 5480–5486
 - [3] Frank C. et al. (2000) *Langmuir*, 16, 1485–1488
 - [4] Chan C. et al. (2008) *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 109:123–154
 - [5] Chan C. et al. (2007) *Analytica Chimica Acta* 584 7–11
- Foto: © psdesign1 - Fotolia.com | NASA

Tracer

Tracer ermöglichen es, mithilfe markierter Moleküle (durch Radioaktivität oder Fluoreszenz) chemische oder biologische Prozesse zu beobachten [engl., zu trace „aufspüren“]. Tracer werden in vielen Bereichen angewendet wie z.B. der Hydrologie, der Meteorologie, der Nuklearmedizin oder der Lufttechnik. In der Hydrologie werden Tracer eingesetzt, um Fließrichtung sowie Fließgeschwindigkeit von Gewässern (Oberflächenwasser und Grundwasser) festzustellen. Hierbei gibt es zwei verschiedenen Arten von Tracern. Umwelttracer, natürliche Substanzen, die im Wasser bereits vorhanden sind und nachgewiesen werden können, sowie künstliche Tracer, die dem Gewässer zugegeben werden müssen.

Besondere Bedeutung haben Fluoreszenztracer wie Uranin erlangt. Neben der Bestimmung des Wasserverhaltens können so auch Lecks in Dächern oder Wasserleitungen festgestellt werden. Aufgrund der extrem starken Grünfärbung von Wasser wird Uranin auch bei Flug- und Schiffsunglücken zur Anfärbung des Meeres genutzt, damit Helfer den Ort besser finden.



Fluoreszenz-Spektakel am St. Patrick's Day: Jährlich am 17. März, dem Gedenktag des irischen Heiligen, ist weltweit die Farbe Grün angesagt. So wird z. B. der Chicago River grün gefärbt. Bis 2003 wurde Uranin verwendet, das dann aufgrund einer Intervention der EPA durch einen anderen Farbstoff ersetzt wurde.

Foto: Wikipedia / Knowledge Seeker

Sanft verdampft. Vakuum-Konzentratoren von Christ

Die **SpeedDry** Produktfamilie
für Vakuumkonzentration



CHRIST 

Martin Christ
Gefriertrocknungsanlagen GmbH

Postfach 1713
D-37507 Osterode am Harz

Tel. +49 5522 5007 - 0
Fax +49 5522 5007 - 12

www.martinchrist.de
info@martinchrist.de