

Labelfreier Nachweis von DNA für die Virusdetektion

Karsten Kleo, Andreas Kapp, Christian Witte, Christoph Tersch, Fred Lisdat

Biosystemtechnik, Technische Hochschule Wildau, 15745 Wildau, Bahnhofstrasse 1

Einleitung

Vaccinia Viren besitzen ein doppelsträngiges DNA Erbgut und gehören zu der Familie der Orthopox Viren. Im Volksmund bekannt als Kuhpocken, trat diese Pockenvariante hauptsächlich bei Rindern auf. Jedoch ist dieser Erreger durchaus infektiös auch für andere Säugetiere; in Deutschland sind einige Fälle dokumentiert, bei denen es zu Infektionen von Katzen, Zootieren und auch Menschen gekommen ist [1]. Immunologisch spielt der Vaccinia Virus eine wichtige Rolle bei der humanen Pockenschutzimpfung, da er eine Immunantwort generiert, welche den Patienten vor einer letalen Pockeninfektion schützt. Bedauerlicherweise rückte der Vaccinia Virus jedoch auch als potentieller Kampfstoff, in den Fokus des Bioterrorismus. Deshalb konnte in den letzten Jahren ein erhöhtes Interesse in der Forschung und Sensorentwicklung für die Detektion von Vaccinia Viren beobachtet werden.

In dieser Arbeit beschreiben wir ein Sensorsystem für die indirekte Detektion von Vaccinia Viren durch DNA-Hybridisierung. Als Sensorsystem wurde die Quarzmikrowaagen Technologie (QCM) und für einen DNA-Amplifikationsschritt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt. Für die Immobilisierung der Fänger-DNA auf dem Sensorchip wurden verschiedene Strategien untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss von Struktur und Länge des zu hybridisierenden Targets auf die Bindung an den Sensorchip analysiert. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte ein Sensor-Durchflusssystem etabliert werden, dessen Sensitivität sich im nanomolaren Konzentrationsbereich bewegt und vergleichbar ist zu anderen markierungsfreien Detektionsmethoden [z.B. 2, 3]. Die resultierende DNA-Detektionszeit konnte, verglichen mit klassischen Methoden, deutlich reduziert werden. Für die Analyse von, durch PCR erzeugte, dsDNA wurde eine Denaturierungsprozedur entwickelt. Dadurch wird bereits bei einer PCR mit 10 Zyklen ausreichend einzelsträngiges Probenmaterial für eine sensitive QCM-Detektion bereitgestellt. Die Spezifität des QCM-Signals und die Signalthöhe kann zusätzlich verstärkt werden. Dies geschieht durch einen zweiten Hybridisierungsschritt mit einem Au-Nanopartikel markierten spezifischen Oligonukleotid.

Darüber hinaus kann die Impedanzspektroskopie als alternatives Detektionsverfahren von DNA-Hybridisierungsereignissen genutzt werden.

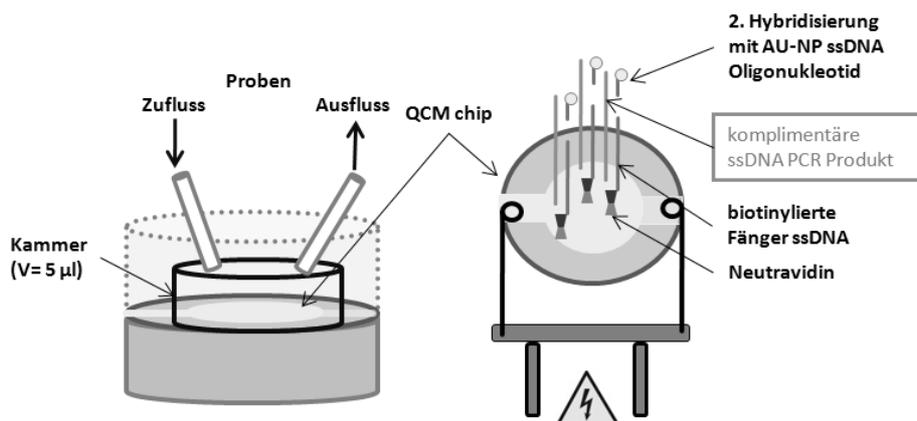


Bild 1 Prinzip des massenempfindlichen DNA-Nachweises: Die Analyse basiert auf die Hybridisierung komplementärer ssDNA mit einer Fänger ssDNA (26mer), in einem mikrofluidischen System. Das Hybridisierungsereignis kann als Massenzunahme auf dem Quarzchip durch eine Frequenzänderung detektiert werden. Ein zweiter Hybridisierungsschritt kann das Messsignal verstärken und zusätzlich die Spezifität der Detektion verifizieren.

QCM Sensorprinzip

Das Messprinzip basiert im Grundsatz auf der Hybridisierung von komplementären DNA-Sequenzen (Bild 1). Um diesen Hybridisierungsereignis zu detektieren wurde in dieser Arbeit zunächst die Quarzmikrowaage eingesetzt. Die QCM ist ein Instrument mit dessen Hilfe durch kleinste Massenänderungen verursachte Frequenzänderung nachgewiesen werden können. Im Zentrum der Quarzmikrowaagen-Technologie steht ein Schwingquarz, der durch Anlegen einer Wechselspannung zu einer resonanten Schwingung angeregt wird. Durch den von Sauerbrey abgeleiteten linearen Zusammenhang zwischen Frequenzänderung Δf und Massenbeladung Δm erlangte die QCM große Bedeutung in der Analytik [4,5]. Die Anwendungsbereiche für die Quarzmikrowaage reichen von der Charakterisierung von Oberflächenmodifikationen und Adsorptionsprozessen über die Charakterisierung von Interaktionen von Biomolekülen [6,7] bis hin zu Detektionen von komplexen biologischen Strukturen, wie zum Beispiel Viren, Bakterien oder Zellen [8,9,10].

In dieser Arbeit wurde der QCM-Sensorchip in einem mehrstufigen Prozess aufgebaut. Nach einer chemischen Reinigung wurde das Gold auf dem Sensorchip zum Aufbau einer SAM (engl. Selfassembled Monolayer) mit MPA (engl. mercaptopropionic acid) beschichtet. Anschließend werden die Carboxylgruppen durch die Inkubation mit N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) aktiviert. Dabei werden die Carboxylgruppen zu Aminreaktiven NHS Estern umgewandelt. Diese stellen eine gute Abgangsgruppe dar und lassen sich durch die Reaktion mit Neutravidin austauschen. Das an die Gold-Oberfläche gebunden Neutravidin liefert schließlich den Bindungspartner für die Biotin-gekoppelten ssDNA Fänger-molekül. Während sämtliche Schritte in einer Batchzelle durchgeführt werden, erfolgt die Neutravidin-Kopplung, sowie die Fänger-molekül Immobilisierung in einer Microfließzelle. Nach erfolgreicher Fänger-molekül- Kopplung an der Sensoroberfläche (Belegungsdichte ca. 11 pmol/cm²), ist der Chip bereit für die Detektion von Hybridisierungsereignissen komplementärer ssDNA.

QCM Sensorcharakterisierung

Zunächst wurde der strukturelle Einfluss des Fänger-moleküls auf das Hybridisierungssignal untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Immobilisierungsstrategien für das Fänger-molekül untersucht. Bei der ersten Immobilisierungsvariante wurde die Fänger-DNA direkt durch eine Biotin-Neutravidin Bindung an die Sensoroberfläche gekoppelt. Um mehr Abstand zwischen der Oberfläche und dem Fänger-molekül zu erzeugen wurde eine 27mer Linker-Sequenz (poly-T) eingefügt. Mit beiden Immobilisierungsvarianten wurden anschließend eine DNA-Hybridisierung durchgeführt. Das Einfügen einer Linker-Sequenz führte jedoch nicht zu einer Verbesserung des Hybridisierungssignals (Bild 2A). Daher wurde für die folgenden Studien die erste, direkte Immobilisierung der Fänger-DNA gewählt.

Um anschließend den strukturellen Einfluss (Länge und Struktur) der Target-Sequenz auf das Hybridisierungssignal zu untersuchen, wurden verschiedene Targetsequenzen mit 5' -Überhang, 3' -Überhang oder 5' und 3' -Überhängen an den DNA-Sensor hybridisiert. Hierbei wurde festgestellt, dass alle untersuchten Varianten sich mit der QCM nachweisen lassen. Die Ausrichtung der Sequenzüberhänge scheint jedoch keinen unmittelbaren Einfluss auf das eigentliche Hybridisierungssignal zu haben. Obgleich in allen Fällen eine Frequenzänderung detektiert wurde, nimmt die Hybridisierungseffizienz jedoch mit steigender Nukleotidzahl ab (Bild 2D).

Die Spezifität dieses Sensorsystems konnte in Kontrollmessungen gezeigt werden (Bild 2C). Auch die Sensitivität dieses DNA-Sensors wurde untersucht und bewegt sich im nanomolaren Bereich, zwischen 1 und 10000 nM (Bild 2B). Mit dieser Empfindlichkeit kann DNA nach Amplifikation detektiert werden.

QCM Detektion von PCR-Produkten

Für eine DNA-Detektion auf der Basis einer Hybridisierung benötigt man einzelsträngige DNA. Da während einer normalen PCR doppelsträngige DNA erzeugt wird, war zunächst ein effizientes

Denaturierungsverfahren (Hitze-Denaturierung und schnelles Abkühlen mit kaltem Puffer) zu entwickeln. Erst dadurch konnte ausreichend ssDNA-Probenmaterial erzeugt werden um Vaccinia-Virus-PCR-Produkte, bereits nach einer 10 Zyklen PCR, erfolgreich und spezifisch nachzuweisen (Bild 2E/F).

Um eine zusätzliche Signalverstärkung zu erreichen wurde ein zweiter Hybridisierungsschritt durchgeführt. Hierbei wurde nach der Bindung des PCR-Produktes an der Sensoroberfläche eine zweite Au-Nanopartikel markierte Enhancersequenz über die Chipoberfläche geleitet. Diese zweite Hybridisierung an dem gekoppelten PCR-Produkt führte zu einer zusätzlichen spezifischen Signalerhöhung (Bild 2E/F).

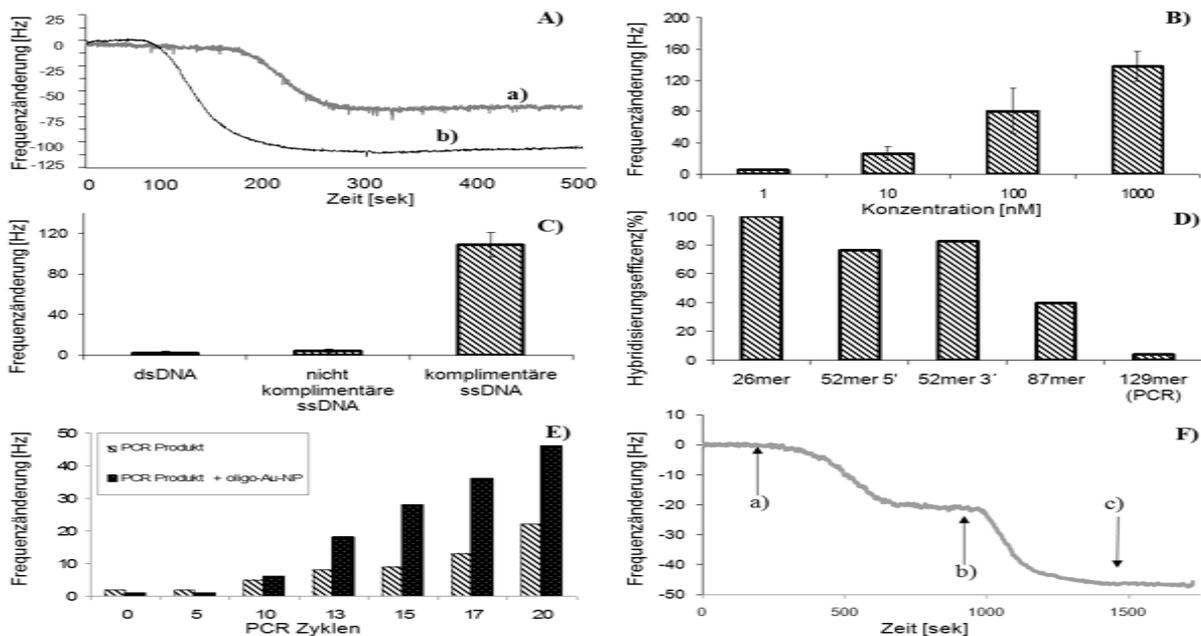


Bild 2 DNA Detektion durch eine Quarzmikrowaage; (A) Struktureller Einfluss von Fänger-DNA (26mer), mit poly-T-Linker (a) und ohne poly-T-Linker (b) zwischen Fänger-DNA und dem QCM-Chip, auf die Hybridisierung von komplementärer ssDNA. (B) Sensorempfindlichkeit bei Hybridisierung verschiedener Konzentrationen von 52mer ssDNA mit 5'-Überhang. (C) Kontrollmessungen mit dsDNA, nicht komplementäre ssDNA (18mer) im Vergleich zu komplementäre ssDNA (26mer). (D) Hybridisierungseffizienz für den Nachweis der Bindung verschiedener Targets. (E) Detektion von PCR-Produkten (129mer) aus verschiedenen PCR-Zyklen und die anschließender Signalverstärkung durch einen zweiten Hybridisierungsschritt, durch eine an Au-Nanopartikel gekoppelte Enhancersequenz (e-seq). (F) Online-Sensorgramm der DNA-Detektion a) Erste Hybridisierung von 129bp ssDNA, b) Zweite Hybridisierung mit der Au-Nanopartikel gekoppelte Enhancersequenz und c) Natriumphosphat Puffer.

Impedimetrische DNA Detektion

Eine weitere Methode zur Detektion der Hybridisierung komplementärer DNA-Sequenzen bietet die Impedanzspektroskopie. Mit dieser Methode lassen sich strukturabhängige, elektrische Eigenschaften eines Elektrodensystems charakterisieren. Aus den erhaltenen Spektren können Rückschlüsse auf elektrische Transportmechanismen sowie Materialeigenschaften gezogen werden. Kommt es auf der Sensoroberfläche zu einem Hybridisierungsereignis zwischen der Fänger-DNA und ihrer komplementären DNA, führt dies zu einer Veränderung der Ladung auf der Sensoroberfläche [Bild 3], welche sich insbesondere in einer Erhöhung des Austauschwiderstandes (R_{ct}) widerspiegelt. Dieser Austauschwiderstand kann als analytisches Messsignal erfasst werden. Die Sensitivität, der auf Impedanzspektroskopie basierenden Sensorelektroden ist vergleichbar mit der auf QCM basierenden Detektionsmethode. Das impedimetrische Messsignal wird beeinflusst durch die Oberflächenbelegung an Fänger-DNA. Bei einer Fänger-DNA Belegungsichte von ca. 15 pmol/cm² erhöht sich der Austauschwiderstand (R_{ct}) auf über 400 % nach einer Hybridisierung [Bild 4]. Auch dieses Sensorsystem ist leicht zu regenerieren und erlaubt eine mehrfache Nutzung der Sensorelektrode [2].

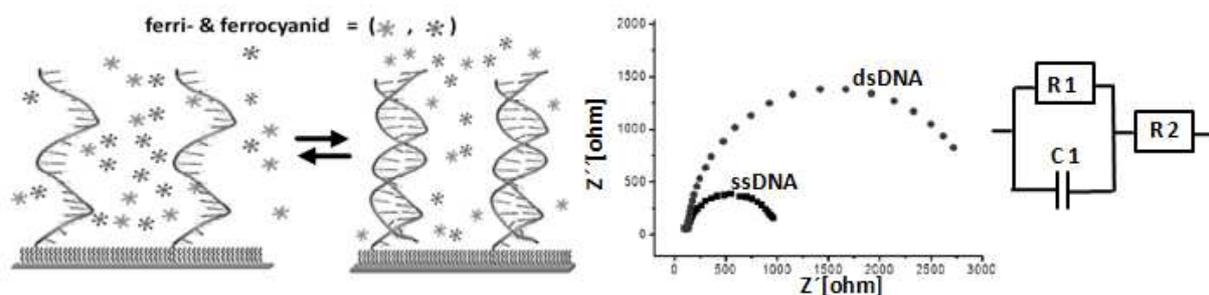


Bild 3 Prinzip der Impedanzspektroskopie: Bei Hybridisierung von DNA auf der Sensoroberfläche kommt es zu einer Veränderung der spezifischen Impedanz. Neben der Elektroden-Kapazität (C1) wird hauptsächlich der Austauschwiderstand (R1) maßgeblich beeinflusst. Der Lösungswiderstand (R2) ist unverändert. Als Redoxsystem wird Kaliumhexacyanoferrat verwendet.

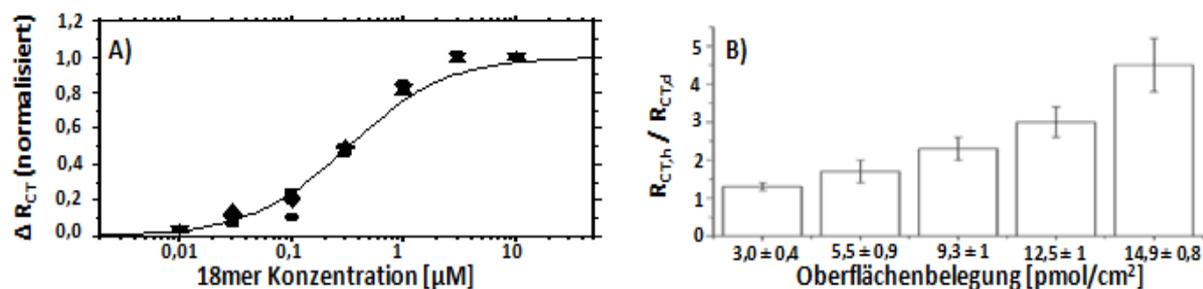


Bild 4 DNA Detektion durch die Impedanzspektroskopie: (A) Sensorempfindlichkeit bei Hybridisierung verschiedener Konzentrationen von 18mer ssDNA. (B) Relative Änderung des Austauschwiderstandes vor und nach Hybridisierung in Abhängigkeit von der Oberflächenbelegung.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit beschreiben wir zwei markierungsfreie Nachweisverfahren zur DNA-Hybridisierung. Die Sensitivität dieser Methoden bewegt sich im nanomolaren Bereich, dies gilt sowohl für auf QCM basierenden DNA-Nachweis als auch für die impedimetrische DNA-Detektion.

Nach einer Denaturierung lassen sich PCR-Produkte spezifisch und in wenigen Minuten mit einem DNA-Sensor nachweisen. In der QCM lässt sich das Messsignal darüber hinaus, durch einen zweiten Hybridisierungsschritt, mit einer Au-Nanopartikel modifizierte Sequenz spezifisch verstärken. Durch die Möglichkeit der Chipregenerierung (Denaturierung) lassen sich die Sensorsysteme mehrfach benutzen, was als ein weiterer Vorteil angesehen werden kann. Die Kombination aus Amplifikation und direkter Detektion bietet eine schnelle, sensitive und spezifische Methode für den Nachweis von Vaccinia Viren.

Literatur

- [1] Robert Koch Institut: Epidemiologisches Bulletin Nr. 10 (2007)
- [2] Kafka J, et al. A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*, 53(25): 746774. (2008)
- [3] Duwensee H., et al. Sequence-specific electrochemical detection of nucleic acids in real samples. *Bioanalytical Reviews* (4): 1-12. (2010)
- [4] Sauerbrey G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Z. Phys.* 155 (2): 206. (1959)
- [5] King W. Piezoelectric sorption detector, *Anal. Chem.* (36): p.1735–1739. (1964)
- [6] Kanazawa K., et al. Quartz crystal microbalance as a sensor to characterize macromolecular assembly dynamics, *J. Sens.* 824947. (2009)
- [7] Balkenhohl T, et al. An impedimetric immunosensor for the detection of autoantibodies directed against gliadins, *Analyst* (132): 314–322. (2007)
- [8] Hong S, et al. QCM DNA biosensor for the diagnosis of a fish pathogenic virus VHSV, *Talanta* (82): 899–903. (2010)
- [9] Shen Z., et al. Nonlabeled quartz crystal microbalance biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions, *Anal. Chem.* (79): 2312–2319. (2007)
- [10] Jia X., et al. QCM detection of adhesion, spreading and proliferation of human breast cancer cells (MCF-7) on a gold surface, *Chin. Chem. Lett.* (17): p. 509–512. (2006)