

Polysaccharidbasierte Immobilisierung

Aminocellulose-Schichten zur Bindung von Proteinliganden für die Affinitätschromatographie

Dr. Peter Miethe¹ und Prof. Dr. Thomas Heinze²

¹ fzmb GmbH – Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie, Bad Langensalza

² Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, Kompetenzzentrum für Polysaccharidforschung (KZP), Friedrich-Schiller-Universität Jena

Die dreidimensionale Affinitätsfiltration ist eine neuartige Variante der Affinitätschromatographie. Sie basiert auf gesinterten mikroporösen Polymerfiltern, die zusätzlich nanoporöse Partikel enthalten können. Die Filter lassen sich in unterschiedlicher Geometrie, unterschiedlichen Dimensionen und unterschiedlicher Porosität herstellen. Nach der Modifizierung der Oberfläche mit einem neuen Typ von Cellulosederivaten, den Aminocellulosen variabler Struktur, werden an den Aminogruppen unterschiedliche chemische oder biologische Liganden immobilisiert. Die Produkte sind sowohl in analytischen als auch in präparativen Laborverfahren einsetzbar.

Aminocellulosen sind neue Typen von Polysaccharidderivaten, die die Modifizierung von unterschiedlichen Materialien mit Mono- oder dünnen Multischichten durch spontane Selbstorganisation erlauben. Damit wird eine Aktivierung der Oberflächen mit reaktiven Aminogruppen möglich, die zur effizienten Immobilisierung von Biomolekülen genutzt werden können. Aminocellulosenmodifizierte Oberflächen wurden bereits umfangreich zur Immobilisierung von Enzymen erforscht [1]. Im vorliegenden Artikel wird die Anwendung der „Aminocellulose-technologie“ im Bereich der Affinitätschromatographie am Beispiel der dreidimensionalen Immunofiltration demonstriert.

Die dreidimensionale Affinitätsfiltration als spezielle Form der monolithischen Chromatographie nutzt dreidimensionale Filter (poröse Formkörper), die sich einfach herstellen sowie konfektionieren lassen und damit ein interes-

santes Funktionselement zur Entwicklung von Produkten für analytische und biotechnologische Laboranwendungen darstellen. Die Filterherstellung kann durch Sintern von Polymeren wie Polyethylen, Polymethacrylat, Polyethersulfon und Polytetrafluorethylen bei 140 bis 300°C erfolgen. Die erhaltenen Mikrofilter weisen innere Oberflächen von 0,1–0,9 m²/g auf. Mit Polymerschüttungen, die zusätzlich nanoporöse Partikel beispielweise auf Basis von Silica, porösem Glas oder Polymethacrylatpartikeln enthalten, können Filter mit einer bimodalen Porengrößenverteilung und mit inneren Oberflächen erzeugt werden, die denen klassischer Chromatographieträger nahekomen (Abb. 1). Die mit Quecksilberporosimetrie bestimmten inneren Oberflächen erreichen bei Beimischungen von ca. 80 Vol. % hochporösem Material bis zu 50 m²/g, was bei einer mittleren Dichte von 0,5 g/cm³ bis zu 25 m²/ml entspricht. Es lassen sich problem-

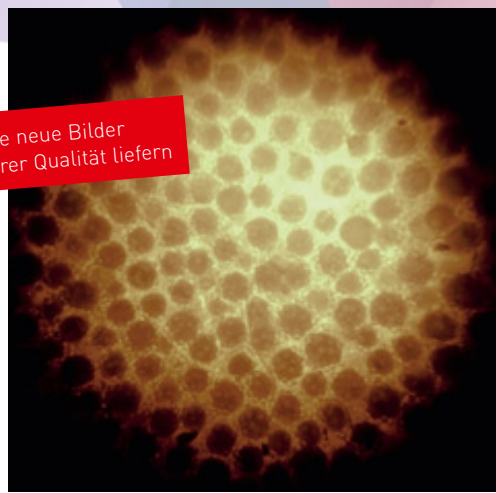
los große Stückzahlen der dreidimensionalen Formstücke einschließlich Membranen herstellen.

Immobilisierung von Proteinen

Mithilfe der Aminocellulose-technologie erfolgt die Modifizierung der Oberfläche der heterogenen Filtermaterialien aus Polyethylen (PE), der Kombinationen von PE/Polymethacrylat, PE/Silica und PE/Glas, in einem einfachen Batchverfahren unter Bildung einer einheitlich hydrophilen inneren Oberfläche [2]. Die eingeführten Aminogruppen können in einfacher Art und Weise zur Immobilisierung von biologischen Liganden genutzt werden (Abb. 2), wobei sich die üblichen Kopplungsverfahren der Biochemie eignen (Kasten). Dreidimensionale Mikrofilter mit immobilisierten biologischen Liganden, insbesondere mit Antikörpern (Immunoaffinitätsfilter), sind sehr stabil und



1/3 Anz



Bitte neue Bilder
in besserer Qualität liefern

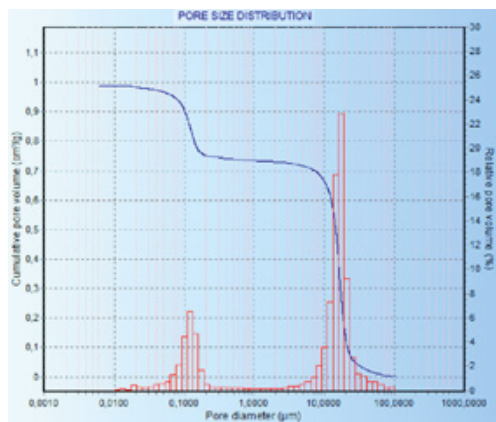
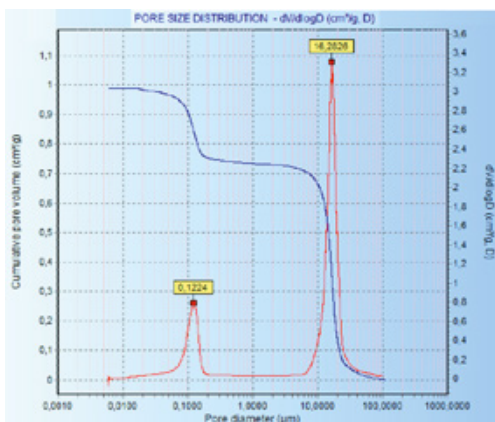


Abb. 1 Mikroporöser Polyethylenfilter mit eingelagerten nanoporösen Silica- (oben links) und Polymethacrylatpartikeln (oben rechts) und typische bimodale Porenverteilung eines Silica/Polyethylenfilters

polysaccharidche

im Fokus

können nach Trocknung bei Raumtemperatur mehrere Jahre ohne Aktivitätsverlust gelagert werden. Bei reinen Polymermikrofiltern liegt die Bindungskapazität für Proteine bei 0,2 mg/g (0,1 mg/ml), bei heterogenem Filtermaterial werden Werte von bis zu 4 mg/ml erreicht.

Immundiagnostik

Das Konzept von dreidimensionalen Filtern wurde bereits in den 90er-Jahren für den Einsatz in immunologischen Schnelltests ausgearbeitet. Unter der Bezeichnung ABICAP® werden Minisäulen für Durchflussimmunoassays eingesetzt (Abb. 3 links, www.senova.de). Diese Assay-technik konnte verifiziert und in mikrostrukturierten Bauteilen und Pipettenspitzen eingesetzt werden (Abb. 3, Mitte). Mit Immunofilterassays, die nach dem ELISA-Prinzip arbeiten, können bei Assayzeiten von ca. 20 min mit entsprechend affinen Antikörpern, Nachweisgrenzen für Proteine im Bereich von 1–10 pg/ml erreicht werden. In einer Reihe von Applikationsstudien ergab sich, dass sich mit dem Verfahren nicht nur Proteine [3], sondern auch Mikroorganismen [4], Viren [5], Lipopolysaccharide [6] und Nucleinsäuren [7] nachweisen lassen. Ein typisches und aktuelles Beispiel ist die Erkennung einer Ebola Virusinfektion durch die Detektion des Capsidproteins VP40 in einem Doppelantikörpersandwich. Wie auch an diesem Beispiel gezeigt werden konnte, sind derartige Durchflussverfahren interessant, wenn ausreichend Probenvolumen zur Verfügung steht und der Analyt zur Steigerung der Sensitivität aus einem größeren Volumen extrahiert werden kann. Die Abbildung 4 zeigt diesen nützlichen Effekt am Beispiel des Nachweises von Ebolavirus aus Urin.

Setzt man anstelle von Enzymkonjugaten einfache Farbpartikelkonjugate ein, so reduziert sich die Analysezeit auf 10 min, wobei allerdings auch die Nachweisgrenze um ca. Faktor 100 steigt. Bei den geschilderten Assays erfolgt die Quantifizierung durch eine einfache photometrische Messung des sorbierten Farbstoffs auf dem Filter im Transmissionsmodus.

Probenextraktion

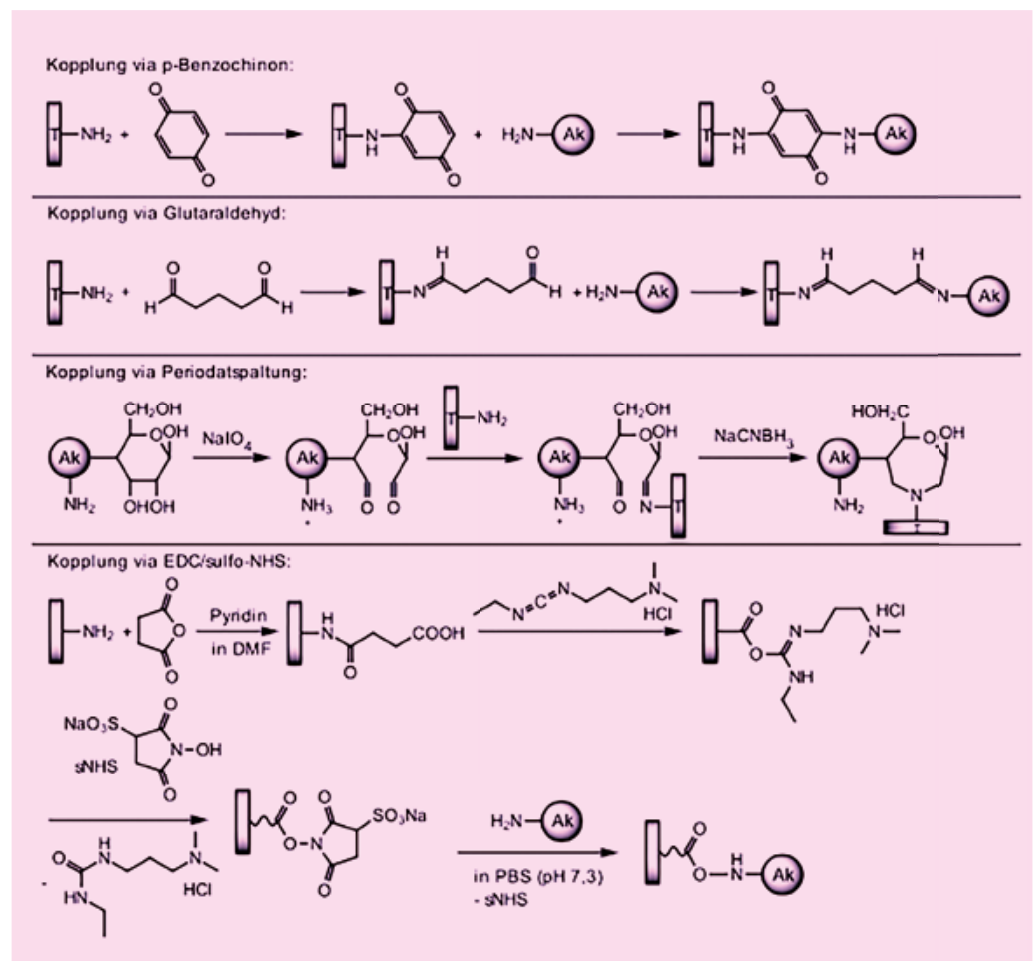
Mit Immunoextraktionssäulen können sehr effizient Analyten aus größeren Probenvolumina extrahiert, nachfolgend eluiert und beispielsweise mittels HPLC quantifiziert werden. Diese Technik ist bei der Analyse von Mycotoxinen etabliert und hat Eingang in die entsprechende Norm (Zearalenon: DIN EN 15792, Desoxynivalenol: DIN EN 15891) gefunden. Die dazu auf dem Markt angebotenen Extraktions-

säulen enthalten üblicherweise ca. 1 ml eines Sepharosegels mit immobilisierten Antikörpern gegen ein Mycotoxin. Da die Konfektionierung und Lagerung von Gelsäulen nicht unproblematisch ist, wurden Extraktionssäulen unter Verwendung von dreidimensionalen Immunoaffinitätsfiltern entwickelt. Dabei kamen die oben beschriebenen Filter mit bimodaler Porengrößenverteilung auf Basis von Polyethylen und Silica zum Einsatz. Mit diesen Materialien lassen sich in einem Filtervolumen von 1,5 ml Bindungskapazitäten erreichen, die denen von konventionellen 1-ml-Sepharosegelsäulen entsprechen. Die Flussraten sowie Proben- und Elutionsvolumina bei beiden Säulentypen sind vergleichbar (Abb. 5).

Auch im Falle der Probenextraktion beschränkt sich das Anwendungspotential der Affinitätsfilter nicht auf das gezeigte Beispiel von niedermolekularen Analyten, sondern ermöglicht es beispielsweise auch Viren anzureichern, die nachfolgend über eine PCR detektiert werden können.

Kopplungsmethoden

(Auswahl) zur Immobilisierung biologischer Liganden



Immunpräzipitation und Proteinreinigung

Mit den Immunoaffinitätsfiltern können auch Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus komplexen Stoffgemischen aufgebaut werden. Sie stellen ebenfalls eine preiswerte Alternative zu etablierten Verfahren auf Basis von Chromatographiematerialien wie Agarose, Sepharose oder Polymethacrylat dar. Das Einsatzspektrum ist dabei sehr vielseitig und wurde im Labormaßstab (Mikrosäulen) am Beispiel der Reinigung von IgG mit Protein A etabliert und lässt sich für HIS-Tag, Protein-G und Concanavalin-A nutzen. Die Mikrosäulen können beispielsweise in einem 96iger-Rack durch Schwerkraft prozessiert werden.

Ausblick

Die dreidimensionale Affinitätsfiltration von aminocellulosemodifizierten Festkörpern ist eine einfache und robuste Technik zur Herstellung

Thüringer Forschungspreis 2014

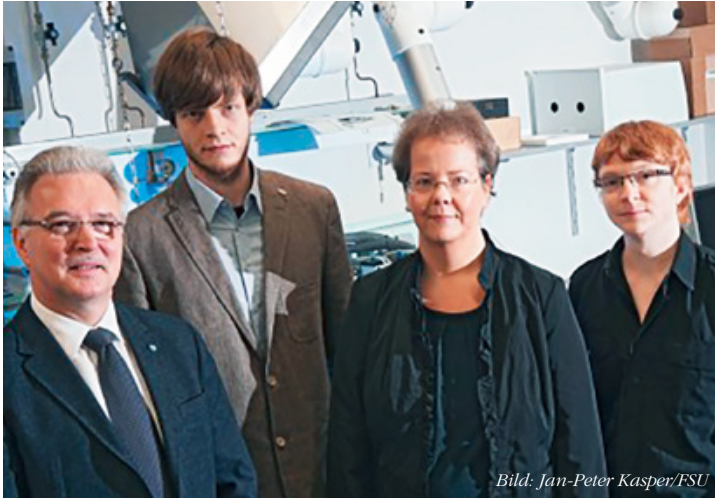


Bild: Jan-Peter Kasper/FSU

Wie Polymerfilme helfen, Medizintests zu verbessern

Für Ihren zur Anwendungsreife entwickelten „Ultrasensitiven immunologischen Schnelltests für die Notfallmedizin auf Basis nanostrukturierter Polymermembranen“ wurden die Chemiker **Prof. Dr. Thomas Heinze** und Dr. Friedrich Scholz von der FSU Jena sowie Katrin Frankenfeld und Christian Rautenberg vom Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie mit dem Thüringer Forschungspreis 2014 in der Kategorie „Angewandte Forschung“ ausgezeichnet. Der ausgezeichnete Schnelltest kommt derzeit vor allem in der Notfallmedizin zum Einsatz, etwa beim Nachweis eines Herzinfarkts.

1/2 Anz

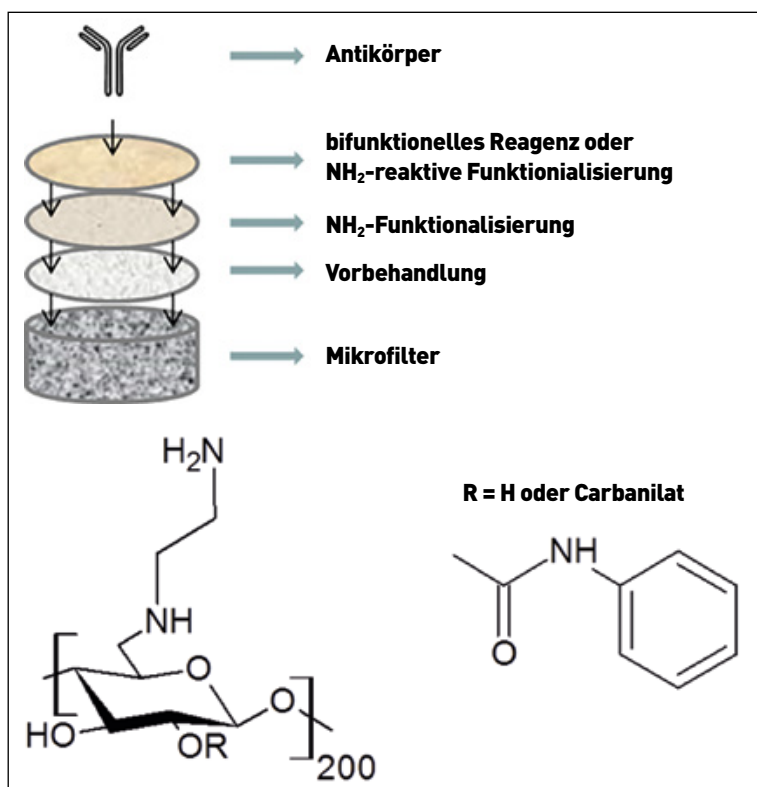


Abb. 2 Schematische Darstellung des schichtweisen Aufbaus eines mit Antikörpern funktionalisierten Mikrofilters (oben). Struktur eines Aminocellulosecarbanilat-Moleküls; über die primären Aminogruppen werden Liganden gekoppelt (unten).

polysaccharidche

im Fokus



Bitte neues Bild
in besserer Qualität liefern

Peter Miethe, studierte Chemie an der Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg, an der er nach einem Industrieaufenthalt am Leipziger Arzneimittelwerk 1986 in Physikalischer Chemie promoviert. Nachfolgend war er Arbeitsgruppenleiter am Biotechnikum der MLU und ab 1991 Entwicklungsleiter und Geschäftsführer in der diagnostischen Industrie. Sein besonderes Interesse gilt seit dieser Zeit der Entwicklung von immunologischen Schnelltests. Seit 2007 ist er Geschäftsführer des Forschungszentrums für Medizintechnik und Biotechnologie In Bad Langensalza.

von Funktionselementen für bioanalytische oder präparative Anwendungen. Vor dem Hintergrund der gezeigten Leistungsdaten, insbesondere bei analytischen Verfahren kann davon ausgegangen werden, dass zukünftig weitere auf Affinitätsfiltern basierende Verfahrensansätze entwickelt werden, wobei miniaturisierte Filterelemente auch mit unkonventionellen Geometrien eine größere Rolle spielen werden. Die wichtige Geometrie der Flachmembran mit typischen Dicken im Bereich von 100–500 µm wird gegenwärtig erforscht. Sie sind eine interessante Alternative zur Nitrocellulosemembran, die gegenwärtig häufig zur Herstellung von Teststreifen eingesetzt wird. Darüber hinaus haben die beschriebenen Materialien prinzipiell das Potenzial für einen Einsatz in der Bioaufarbeitungstechnik. Inwieweit sie dabei gegen etablierte Chromatographieträger bestehen können, muss weiter untersucht werden. Dabei spielt auch das Design der Struktur der Aminocellulosen und ihrer Schichtbildung eine herausragende Rolle.

→ thomas.heinze@uni-jena.de
→ pmiethe@fzmb.de

Literatur

- [1] Heinze, T. et al. (2015) *Macromol. Biosci. mabi.201500184R1*
- [2] Elschner, T. et al. (2014) *Macromol. Biosci. 14*, 1539–1546
- [3] Stelzmann, M. (2011) *Inaugural-Dissertation Freie Universität Berlin*
- [4] Bauermeister, C. & Miethe, P. (2002) *Dentognostics Jul, 18 WO 2002/055733 Munjal, S. et al. (2007) Ann. N. Y. Acad. Sci. 1098, 486–489*
- [5] Lucht, A. et al. (2007) *J. Infect. Dis. 196, 2, 184–192*
- [6] Grunow, R. et al. (2008) *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, 16, 1, 30–54*
- [7] Rathgeber (2008) *Diplomarbeit FH Jena*



Abb. 3 Formate für immunologische Durchflussanalysen auf Basis von Affinitätsfiltern, links ABICAP (Antibody Binding Immuno Column for Analytical Purpose) mit Positiv-, Negativ- und Messfilter (von oben nach unten), Mitte analytische Pipettenspitze, rechts Lab-on-Chip der Fa. ChipShop GmbH Jena

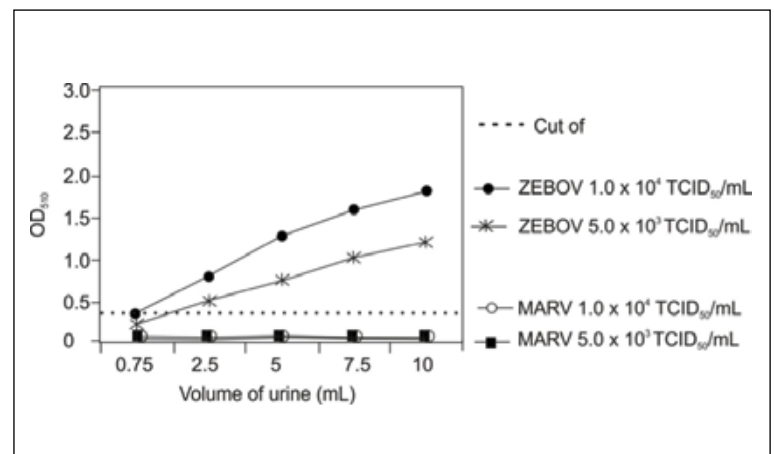


Abb. 4 Abhängigkeit des photometrischen Signals (optische Dichte, OD) eines enzymatischen Ebola-VP40-ABICAP-Testes von der aufgegebenen Urinmenge für zwei unterschiedliche Viruspartikelkonzentrationen am Beispiel eines Filters mit immobilisierten Antikörpern gegen Ebola-Virus Stamm Zaire (ZEBOV). Die Bindung ist spezifisch, Marburgvirus (MARV) wird nicht gebunden [5].

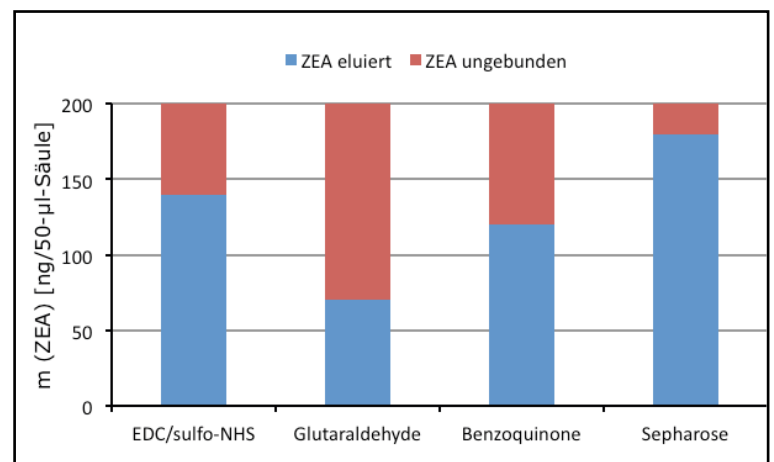


Abb. 5 Vergleichende Untersuchung von Extraktionsssäulen auf Basis von Sepharose und Immunfiltern unter Berücksichtigung der Immobilisierungsmethode. Die Antikörperaktivität gibt an, welche Zearalenon (ZEA)-Menge des theoretischen Maximalwertes tatsächlich gebunden werden konnte.