

Label-free molekylær målemetode

**Nyudviklet chip til måling og analyse af molekylære interaktioner.
Teknologien tillader måling af reaktion mellem alle slags molekyler**

Af udviklingsingeniør Jacob Thaysen, Michael Kerrn-Jespersen og Lars Kildemark Nielsen, Cantion A/S

Cantion har udviklet biochippen Canti4, der kan bruges til måling og analyse af molekylære interaktioner uden brug af mærkning som f.eks. fluorescens eller radioaktivitet.

Teknologien tillader i princippet måling af en reaktion mellem alle slags molekyler, hvis det er muligt at binde det ene molekyle til sensorens overflade. De molekylære reaktioner kan f.eks. være antigen-antistof-, protein-protein-, protein-ligand eller DNA-hybridisering. Målingen er uafhængig af molekylemassen og kan bruges til at analysere både store og små molekyler.

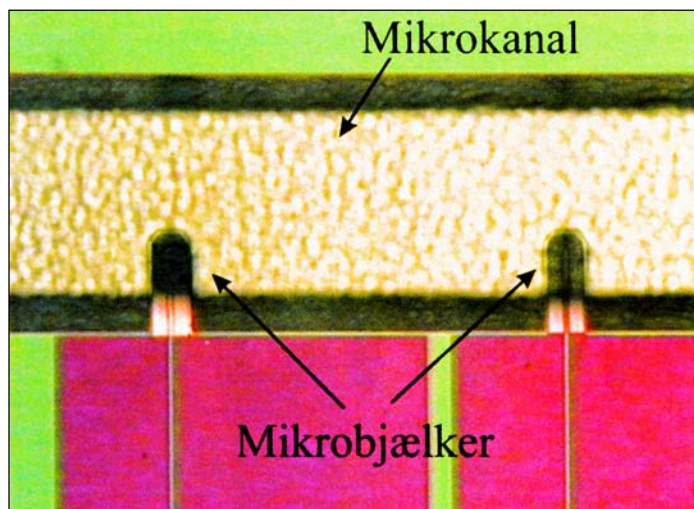
Målingerne foregår real-time og er samtidig kvantitative. Det giver mulighed for simpelt og hurtigt at lave affinitets- og bindingskinetiske undersøgelser. Målemetoden egner sig både til væske og gas, og da der kan fremstilles op til 100 sensorer på samme chip, kan der laves undersøgelser på forskellige molekylære interaktioner samtidigt.

Chippen bruger meget lidt reagens- (pL-volumen) og prøve-mængde (µL-volumen), hvilket gør målemetoden specielt interessant ved undersøgelser, hvor prøve- eller reagensmængden er kritisk.

Teknologien er velegnet til brug for forskningsinstitutioner og udviklingsafdelinger, high-throughput screening i den farmaceutiske industri og endelig *point-of-care*-markedet, der omfatter fødevarerindustrien, men specielt human diagnostik.

Måleprincip

Den følsomme sensoren består af en lille mikrobjælke, der er 125 µm lang og 0,5 µm tyk. Til sammenligning er et menneskehår ca. 100 µm tykt. Den lille og meget fleksible bjælke er fremstillet i silicium vha. den samme teknologi, der i dag bruges ved fremstilling af computerchips. Dvs. fremstillingsteknikken er billig og enkel og gør det muligt at producere store mængder med stor reproducerbarhed. Mikrobjælken sidder inde i en mikrokanal, hvilket er grunden til, at der kan sendes meget små prøvemængder



Figur 1. Billedet viser to mikrobjælker, der stikker ud i en mikrokanal. Bjælkerne er 125 µm lange og 50 µm brede. Kanalen er 300 µm bred.

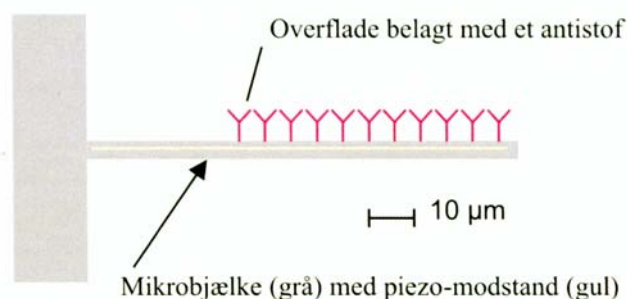
forbi bjælken. Figur 1 viser et billede af to mikrobjælker i en mikrokanal.

Inde i mikrobjælken ligger der en piezo-modstand, der kan ændre sin modstandsværdi som funktion af modstandens udbøjning. Når bjælken udbøjes, vil piezo-modstanden derfor ændre sin værdi, og ved at monitorere denne modstandsændring kan man afgøre, hvor meget bjælken bøjer.

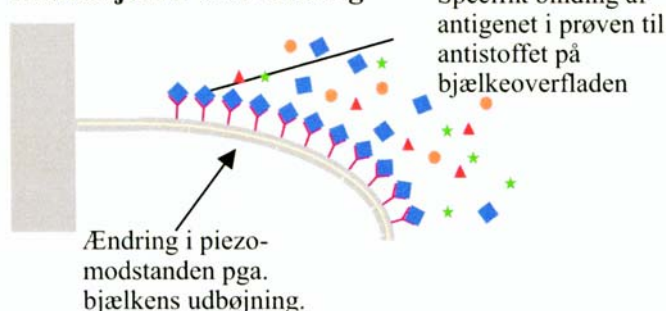
Ved at funktionalisere en mikrobjælkes overflade med f.eks. et antistof og sende en prøve som indeholder det tilhørende antigen igennem mikrokanalen, vil antigenet reagere med antistoffet. Når denne reaktion foregår på mikrobjælken overflade, vil overfladeenergien på bjælken ændre sig, og dermed ændres overfladespændingen på den side, hvor reaktionen foregår. Denne ændring får mikrobjælken til at bøje. Ændringen i overfladespændingen er et almindeligt fysisk-kemisk fænomen, der normalt ikke har nogen praktisk betydning, men som her udnyttes som universelt måleprincip. Bjælken udbøjning er en funktion af antigenkoncentrationen i prøven, og reaktionen kan følges real-time ved at monitorere ændringen i piezo-modstanden. Figur 2 viser et eksempel på, hvordan mikrobjælken kan anvendes som en meget følsom sensor.

Mikrobjælken udbøjer kun nogle få nanometre, og for at få et

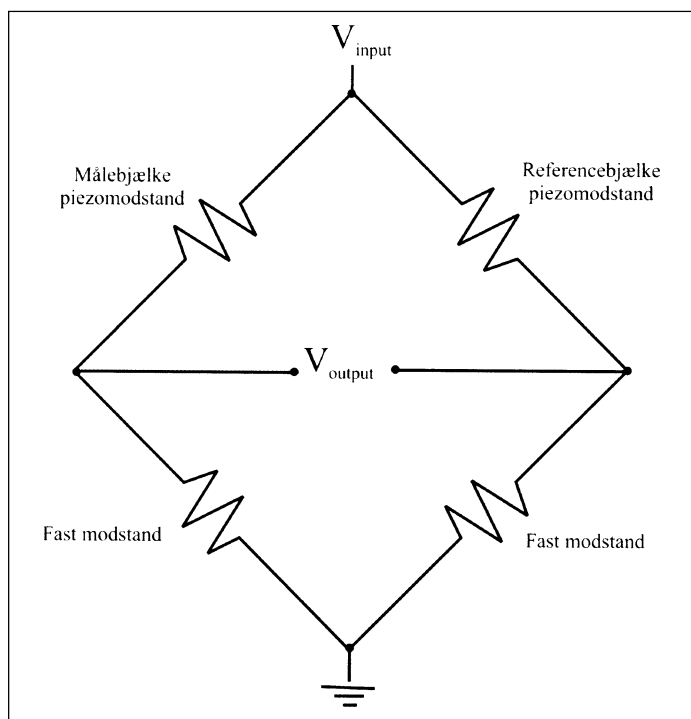
Mikrobjælke før måling



Mikrobjælke efter måling



Figur 2. Principskitse af en mikrobjælke før og efter en molekylær reaktion på bjælken overflade. Mikrobjælken bøjes pga. en ændring i overfladeenergien. Udbøjningen kan udlæses vha. den integrerede piezo-modstand.



Figur 3. Wheatstone-bro bestående af en målebjelke, referencebjælke og to faste modstande. Den symmetriske konfiguration gør det muligt at filtrere uspecifikke bindinger samt vibrations- og temperaturændringer, som begge bjælker oplever.

godt signal-støj-forhold indsættes mikrobjælken piezomodstand normalt i en Wheatstone-bro (figur 3). Wheatstone-broen oversætter modstandsændringen til en spændingsændring, hvilket er lettere at udlæse ved meget små værdier. Som det også fremgår af figur 3, består Wheatstone-broen af målebjelken, en referencebjælke samt to faste modstande. Referencebjælken har det formål at fjerne termisk og mekanisk støj, f.eks. fra rystelser i måleopstillingen. Ved at belægge referencebjælken med et molekyle som ligner det, der ligger på målebjelken, vil signalet pga. uspecifikke bindinger på både målebjelken og referencebjælken fjernes.

Der fremstilles chips med flere mikrobjælker i samme mikrokanal, så det er muligt at bruge en af bjælkerne som referencebjælke og de andre som målebjælker.

Måling på C-reaktivt protein (CRP)

CRP er et akut-fase protein der normalt findes i blodet i meget lave koncentrationer, men ved en bakteriel infektion kan stige voldsomt til koncentrationer over 100 mg/L.

I et forsøg er målebjelken blevet belagt med CRP-antistof, mens referencebjælken er belagt med bovin serum albumin (BSA). Forsøget er vist i figur 4. I forsøgets start kører der en buffer gennem mikrokanalen, men ved $t=150$ sekunder ændres opløsningen til buffer + 100 mg/L CRP. På den violette kurve ses det, at signalet fra Wheatstone-broen i løbet af ca. 100 sekunder ændrer sig til en ny stabil værdi, hvilket angiver at reaktionen er slut.

Forsøget blev gentaget ved at regenerere bjælkeoverfladen og sende en ny portion 100 mg/L CRP gennem kanalen. Igen ses der, fra den blå kurve, et signal med samme amplitude og stabiliseringstid. For at afgøre om der er tale om en specifik reaktion på målebjælken overflade, blev chippen endnu engang regenereret, denne gang blev der dog ført en opløsning bestående af buffer + 100 mg/L BSA igennem. Det kan ses på den røde kurve, at dette ikke gav et signal, og hermed kunne det fastslås, at der virkelig er tale om et specifikt CRP-signal fra de to andre kurver.

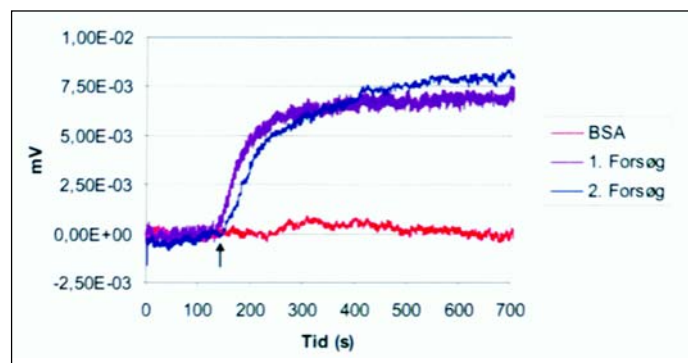
Måling af DNA-hybridisering

Målebjelkeoverfladen er i dette forsøg belagt med en tynd guldfilm. Denne guldoberflade anvendes til funktionalisering vha. thiol-guld kemi. Ved at lade en thiol-modificeret enkeltstrenget DNA-oligo reagere med guldoberfladen dannes der et monolag af DNA-oligoer på målebjelkeoverfladen. Hermed er målebjelken parat til at reagere med den komplementære DNA-streng.

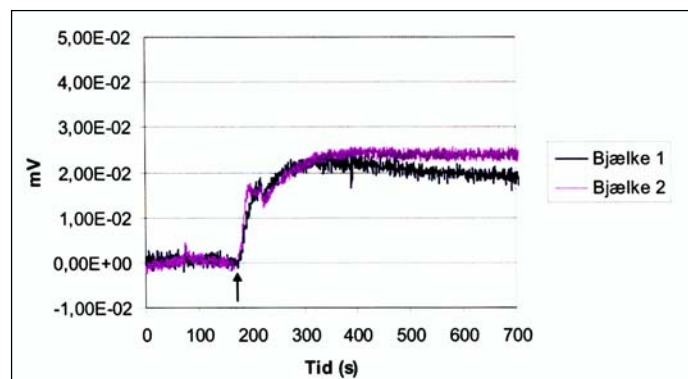
Figur 5 viser et forsøg, hvor to målebjælker er blevet belagt med DNA-oligoer. Først pumpes der buffer gennem kanalen, men ved $t=175$ sekunder introduceres der en opløsning bestående af buffer + 1 μ M af den komplementære DNA-streng i mikrokanalen. Som det ses af figuren ændrer begge målebjelker signal i løbet af 150 sekunder, hvorefter et nyt stabiliseringsniveau indtræder.

Som det fremgår af disse eksempler, kan chippen bruges til real-time undersøgelser af molekylære interaktioner og derved opnås værdifuld viden om koncentration, affinitet og kinetik uden brug af mærkede molekyler. Se mere på Cantions hjemmeside www.cantion.com.

E-mailadresse:
Jacob Thaysen: jt@cantion.com



Figur 4. 100 mg/L CRP er introduceret i mikrokanalen ved $t=150$ sekunder (angivet ved pilen). Det ses, at signalerne fra bjælkerne med CRP-antistof stabiliseres efter ca. 100 sekunder, mens signalet fra bjælken med BSA ikke reagerer på CRP.



Figur 5. Grafen viser et DNA-hybridiseringsforsøg. Den komplementære DNA-streng introduceres i kanalen ved $t=175$ sekunder. Det ses, at signalet fra de to bjælker stabiliseres efter ca. 150 sekunder.