

Multi-analytprofilering med suspensionsarraysystem

Suspensionsarrayteknologien er et fleksibelt alternativ til chipbaserede mikroarrays. Den kan bl.a. bruges inden for antistofbaserede immunoassays, SNP og transkriptionsprofilering. Her beskrives systemet

Af Jens Dyekær, produktspecialist, AH Diagnostics

Chromoforenes koncentrationer kan varieres, så emissionsintensiteterne har 10 distinkte værdier, der kan genkendes af Luminex LabMAB100-instrumentet og gængse flowcytometre som FACScan eller FACSCalibur [1]. Med ti forskellige mulige værdier på de to interne farvestoffer findes der 100 forskellige »bead regions« eller bead-typer.

Foruden de to interne fluoroscenschromoforer omfatter systemet en tredje fluoroscenschromofor, et »reporter dye« (PE, emitterer orange lys), som kvantificerer den pågældende analyt.

Ønsker man at opsætte et multiplex ELISA-assay for fire cytokiner, f.eks. IFN γ , IL-2, IL-4 og IL-10, kobles der monoklonale anti IFN γ capture-antistoffer til en bead-type. Det er en forholdsvis ukompliceret kemisk proces, der beskrives i specifikationerne fra producenten. Til en anden bead-type kobles der monoklonale anti IL-2 capture-antistoffer, osv. for alle fire analytter. Som med ELISA-kits, findes der præfabrikerede antibody bead kits, der kan kombineres efter ønske. De antistof-coatede beads blandes og inkuberes med prøven. Akkurat som i et konventionelt ELISA, hvor analytten binder til det immobiliserede capture-antistof i brøndene på mikrotiterbakken, bindes analytterne til deres respektive antistof-coatede beads. Dernæst inkuberes med PE-konjugerede detektionsantistoffer mod de fire analytter, hvorefter prøven er klar til måling på Luminex-instrumentet eller et cytometer.

I løbet af prøvepræpareringen og særligt efter inkubationen med detektionsantistoffet kan der optræde et eller flere vasketrin. Blandt brugere såvel som producenter af præfabrikerede antibody bead kits varierer meningene om nødvendigheden af vasketrin. Nogle hævder, at eftersom systemet kun registrerer signal fra detektionsantistof associeret med beads og ikke frit antistof, er det unødvendigt at vaske, i modsætning til konventionelt ELISA hvor ubundet detektionsantistof skal fjernes, for at den kvantitative farvereaktion er proportional med analyttens koncentration [2]. Der er tale om et kompromis mellem bekvemmeligheden og tidsbesparelsen ved at undlade at vaske og behovet for høj følsomhed, som forudsætter minimering af baggrunden.

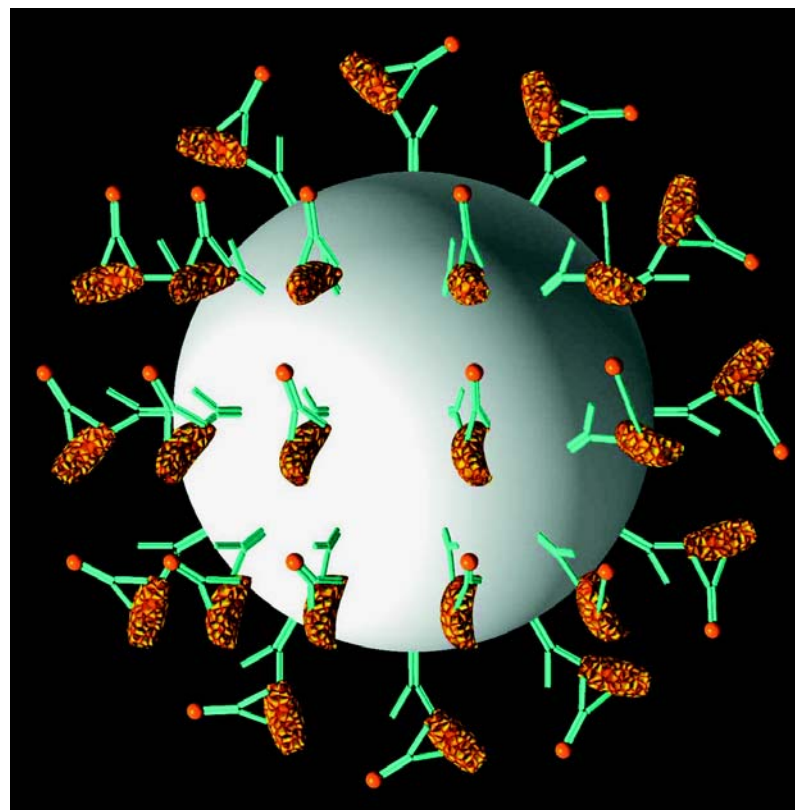
Med Luminex-instrumentet er vask af beads overkommeligt, idet hele proceduren foregår i 96 brønds mikrotiterbakker. Disse findes med filterbunde, så vaskebuffer nemt og hurtigt kan fjernes vha. en vakuum-manifold.

Instrumentet

Luminex LabMAB100-instrumentet består af en flowcytometer-del, en mikrotiterbakke XY-plattform og en pc udstyret med software til fremstilling af standardkurver og optagelse og præsentation af data.

Fra mikrotiterbakken i XY-plattformen opsuges prøven og

føres ind i flowcytometer-delen. Her ledes beadene enkeltvis gennem to lasere: En 523 nm Nd-YAG-laser, der exciterer PE-konjugatet på detektionsantistoffet, og en 635 nm diode-laser, der exciterer det røde og infrarøde interne farvestof [3]. Emissionen fra PE-konjugatet kvantificeres med en PhotoMultiplier Tube (PMT) og er direkte proportional med mængden af bundet analyt. Emissionen fra de interne fluoroscenschromoforer i bead'en kvantificeres med Avalanche Photodiodes (APD) og angiver, hvilken analyt der måles på. Dataene overføres til pc'en.



Sandwich ELISA i Luminex-formatet: Komplex af captureantistof-coated Luminex-bead, analyt og R-PE-mærket detektionsantistof. Luminex-beads kan også coates med ss/dsDNA-prober, peptider og proteiner (herunder receptorer) til SNP og transkriptionsprofilering, protein-DNA bindingsassay, kinase/protease assay og protein-protein interaktionsassay.

For hver bead-type aflæses minimum 100 beads. Dataene giver en middelværdi for koncentrationen af den pågældende analyt. Derfor behøver man ikke som i konventionel ELISA at lave dobbeltbestemmelse. Det sidste forudsætter naturligvis god pipetteringsteknik og gode low-binding pipettespidser. ►

Datahåndtering

Multiplex-måling på en 96 brønds mikrotiterbakke giver mange data. Måler man f.eks. på 15 cytokiner, giver det 15 standardkurver á 8 punkter, dvs. 105 datapunkter. Dertil kommer 88 datapunkter for 15 cytokiner, i alt $1320+105=1425$ datapunkter. Er pc'en ikke udstyret med velegnet software, giver sådanne datamængder et stort »klip og sæt ind« arbejde i Excel-filer. Der findes flere firmaer, der fremstiller specialdesignet software, som automatisk optager data fra Luminex-instrumentet, fremstiller standardkurver, færdigbehandlede data og præsenterer dem i skemaer og søjle-diagrammer osv.

High throughput screening

Ud over at kunne måle på flere analytter har systemet en væsentlig kapacitet for high throughput screening. Har man f.eks. behov for at måle bare én biologisk faktor, såsom aktiveret (phosphoryleret) MAP Kinase p38 i cellelysater, og screene for effekten af et stort antal farmakologiske stoffer på cellekulturer, kan det gøres i et fascinerende omfang og tempo. I stedet for at koble forskellige capture-antistoffer på hver sin bead-type, kobler man det samme antistof på 100 forskellige bead typer. Hver bead-type inkuberes med én prøve og blandes herefter. Blandingen overføres til en brønd på en mikrotiterbakke. Denne proces gentages for alle 96 brønde. Det giver 100 prøver gange 96 brønde, i alt 9600 prøver, der kan måles på under en halv time. Opsætningen kræver, at de involverede antistoffer har høj affinitet, og at målingen sker hurtigt efter sammenblanding, så der ikke indstilles en ny ligevægt, hvor protein fra de enkelte prøver fordeler sig på andre beads. Arbejdet kan automatiseres med computerstyrede robotter.

Det nye Luminex Corporation Luminex HTS integrerer og automatiserer den beskrevne high throughput opsætning. Systemet understøtter kun 64 bead-typer, men kan måle på 8 analytter i 8 brønde på en gang, dvs. en hel række i en mikrotiterbakke, og kan evaluere en 96 brønds bakke på mindre en syv minutter. Det kan kombineres med en Twister II Plate Handler, så der automatisk kan føres en stak mikrotiterbakker ind i systemet.

Tværfaglig anvendelse

Ud over de antistofbaserede immunoassays har systemet en række andre anvendelsesmuligheder. Det kan f.eks. kobles med biologisk aktive receptorer (i stedet for capture-antistoffer) og derved opsættes multiplex receptor-ligand assays svarende til BioLISA-assays. Sådanne assays kan opsættes for intracellulære såvel som ekstracellulære protein-protein-interaktioner [4]. For signaltransduktionsstudier er dette en væsentlig rationalisering af arbejdsgangen, idet systemet også kan bruges til multiplex kinase aktivitets-assays og multiplex peptid kløvnings-assays. Peptider, svarende til biologiske substrater for udvalgte kinaser, kan kobles på beads. *In vitro* phosphorylering ved inkubation med cellelysat og efterfølgende inkubation med phosphorspecifikke detektionsantistoffer giver et gel-frit multiplex kinase assay. Tilsvarende kan beads kobles med proteasesubstrat-peptider konjugeret med PE. Ved celleaktiveringsmedieret kløvning frakobles »repoteren«, så fluorescens-signalet er omvendt proportionalt med aktiviteten af den pågældende protease.

Man kan også koble DNA-oligoer til bead'ene. Ved at koble komplementære ssDNA-prober for op til 100 forskellige transkripter på beads og hybridisere med total RNA, kan man optage en kvantitativ transkriptionsprofil [5]. Med punktmutations-specifikke DNA-prober koblet på beads og enkeltbase primer-extensionsteknik muliggør systemet high throughput Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-analyse [6].

Ny teknologi med begrænset udbredelse i Danmark

I USA har systemet været på markedet i godt fem år. Der er i den tid publiceret en beskedent mængde artikler (www.luminexcorp.com/tech/bulletins). Herhjemme er der endnu kun ganske få brugere, fordelt på Statens Serum Institut, LEO Pharma og Hvidovre Hospital, hvilket formentlig kan skyldes den sædvanlige latenz for nye teknologier og metoder på det europæiske marked ift. det amerikanske.

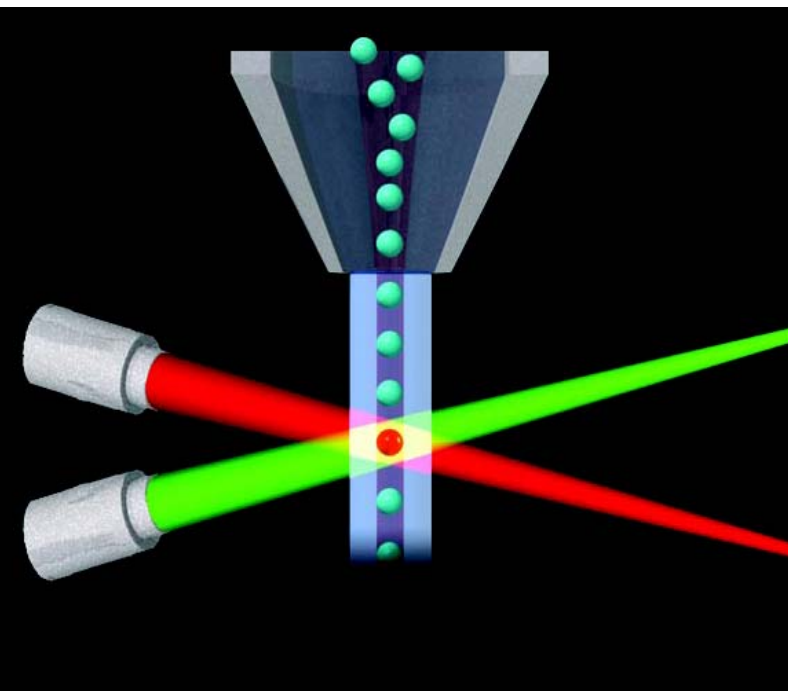
En anden årsag kan være den betragtelige investering på ca. 400.000 kr., som instrumentet inkl. pc og software koster. Systemet har imidlertid så mange anvendelsesmuligheder, at det kan deles af mange brugere med forskellige fagområder.

E-mail-adresse:

Jens Dyekær: jdn@ahdiag.dk

Referencer

1. Carson, RT, Journal of Immunological Methods 227, 1999, pp41-52
2. Joos, TO et al., Current Opinion in Chemical Biology 2002, 6:76-80
3. Earley MC et al, Cytometry 50:239-242 (2002)
4. Iannone MA et al 2001, Cytometry 44:326-337
5. Yang L. Genome Research 2001 Nov;11 (11):188-98
6. Chen J, Genome Reserach 10:549-557 (2000)



Luminex-beads ledes gennem en 523 nm Nd-YAG-laser, der exiterer PE-konjugatet på detektionsantistoffet, og en 635 nm diode-laser, der exiterer de interne fluorochromer.