

# B-Kampfstoffe – Parallele und schnelle Analytik durch Antikörper-Arrays

Dr. Birgit Hülseweh, Dr. Hans-Jürgen Marschall,  
Wehrwissenschaftliches Institut für Schutztechnologien – ABC-Schutz, Munster;  
Dr. Ralf Ehricht, CLONDIAG chip technologies GmbH, Jena

Die Bedrohung durch biologische Kampfstoffe ist nach einer langen Phase der bewußten Verdrängung mit den in ihrer Herkunft bisher nicht abgeklärten Milzbrand-Briefen in den USA wieder in den Blick von Öffentlichkeit, Politik und Militär gerückt. Ein Angriffsrisiko mit Biowaffen (BW-Agenzien) erscheint zwar gering, da die Herstellung und der Einsatz von B-Waffen ein großes Maß an wissenschaftlichen und technischen Fähigkeiten erfordert, ist aber nicht unrealistisch. Die Brisanz von B-Kampfstoffen liegt in der Tatsache, daß diese geruch- sowie geschmacklos und in der Regel unsichtbar sind. Im Hinblick auf Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten für Abwehrmaßnahmen besteht nach wie vor ein großer Handlungsbedarf.

**Key Words:** Protein-Chip, Microarray, Biowaffen, Immunoassay

Waffenfähige biologische Agenzien kennzeichnet in der Regel eine effiziente Verbreitung via Aerosol, eine hohe Penetranz und die mangelhafte Möglichkeit der Prophylaxe und Therapie.

Neben *Bacillus anthracis* werden das Variolavirus (Erreger der menschlichen Pocken), *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, hämorrhagische Fieberviren wie VEE-, Ebola-, Marburg- und Hanta- Virus, sowie das Botulinum-Toxin in die Kategorie der Agenzien mit höchstem BW-Potential eingruppiert. Von einigen dieser Erreger wurden im Rahmen des Biowaffenprogramms der früheren UdSSR große Mengen produziert. Waffenfähige Vorräte aus diesem Programm könnten noch heute existieren.

Aktuell besteht daher eine wachsende Nachfrage nach neuen schnellen und

spezifischen Detektionsmethoden für BW-Agenzien, sowohl für Umwelt- als auch für medizinische und Lebensmittelproben.

Besonders in der B-Abwehr und für die Risikoabschätzung ist die frühe und gesicherte Identifikation von Bakterien, Viren und Toxinen von großer Bedeutung. Neben einer schnellen und sicheren Evaluierung sind hier ein hoher Automatisierungsgrad, einfache und sichere Bedienung sowie Robustheit und Tragbarkeit von Geräten gefragt.

Aufbauend auf den Fortschritten in der DNA-Chip-Technologie erscheinen daher Protein-Microarrays für diese Anwendungen geeignet. Im Gegensatz zu DNA-Arrays sind Protein- oder Antikörper-Arrays nicht auf den Nachweis von DNA- und RNA-haltigen Erregern beschränkt, sondern können

auch für die Toxin-Erkennung herangezogen werden. Protein-Chips werden heute bereits vermehrt in der Forschung verwendet, ein Einsatz in der Routinediagnostik steht aktuell aber noch aus<sup>2-6</sup>.

Im Vergleich zu DNA-Arrays sind das Design und die Herstellung von Antikörper-Arrays kritisch, da die Funktionalität und Langzeitstabilität der Antikörper nach der Immobilisierung auf der Chipoberfläche sichergestellt werden muß. Prozesse, die zu Änderungen der Konformation oder Denaturierung der Proteine führen, müssen vermieden werden. Hinzu kommt, daß die Herstellung eines zuverlässigen Antikörper-Chips für die Identifizierung von Mikroorganismen eine sorgfältige Auswahl und Abstimmung von Fänger- und Nachweisantikörpern erfordert. Kreuzreaktionen müssen minimiert, die Affinität und Spezifität des Antikörpers optimiert werden. Im Vergleich zu anderen Array-Systemen<sup>2,7-10</sup> ist das kürzlich entwickelte Array Tube™ (AT)-System eine kostengünstige und leicht handzuhabende Plattform für die Entwicklung und Etablierung von Protein- und DNA-Arrays unterschiedlicher Formate mit Potential zur Automatisierung und zum Datentransfer.

In diesem Artikel möchten wir einen Protein-Chip beziehungsweise Antikörper-Array auf AT™-Basis vorstellen, welcher die simultane Detektion mehrerer als Biowaffen (BW) anzusehender Agenzien auf immunologischer Basis erlaubt.

Spezifische Immunoassays wurden für das *Staphylococcus*-Enterotoxin B (SEB), Ricin, die Gruppen der Alpha- und Flaviviren, die Gruppe der Orthopockenviren, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Brucella melitensis*, *Burkholderia mallei* und *Escherichia coli* EHEC O157:H7 entwickelt. Durch eine sorgfältige Auswahl und Abstimmung von Fänger- und Nachweisantikörpern sind wir aktuell in der Lage, fünf der BW-Agenzien des sogenannten „Dreckigen Dutzends“ parallel auf einem einzigen Chip nachzuweisen.

Tab. 1: Experimentell ermittelte Nachweisgrenzen für verschiedene Biowaffen-fähige Agenzien

Analyt	Inaktivierung	Detektionsgrenze
Vaccinia	nicht inaktiviert	5x10 <sup>3</sup> KID <sub>50</sub> /ml
YFV 17D	nicht inaktiviert	≤ 1x10 <sup>5</sup> KID <sub>50</sub> /ml
SLEV	β-Propionolacton	5x10 <sup>6</sup> KID <sub>50</sub> /ml
WNV NY	β-Propionolacton	6x10 <sup>2</sup> KID <sub>50</sub> /ml
VEEV TC83	β-Propionolacton	≤ 2x10 <sup>6</sup> KID <sub>50</sub> /ml
<i>E. coli</i> 0157:H7	Hitze	5x10 <sup>3</sup> KBE/ml
<i>Y. pestis</i>	Hitze & Formaldehyd	≤ 5x10 <sup>5</sup> KBE/ml
<i>F. tularensis</i>	Hitze & Formaldehyd	2x10 <sup>6</sup> KBE/ml
<i>B. mallei</i>	Hitze & Formaldehyd	≤ 2x10 <sup>6</sup> KBE/ml
<i>B. pseudomallei</i>		
<i>B. melitensis</i>	Hitze & Formaldehyd	1x10 <sup>6</sup> KBE/ml
SEB	nicht inaktiviert	0,2 ng/ml
Ricin	nicht inaktiviert	≤ 0,1 ng/ml

## Chip-Produktion, Analyse und Meßprinzip

Das Herzstück des ArrayTubes™ ist eine chemisch modifizierte Glasoberfläche, welche in den Boden eines 1,5 ml-Polystyrolröhrchens eingelassen ist. Auf einer Chip-Grundfläche von 3 x 3 mm können so durch Kontaktpotting etwa bis zu hundert Antikörper-Reaktionsflächen in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml und mit einem Spottdurchmesser von ungefähr 80 bis 120 µm aufgebracht werden. Als ideal hat sich das Spotting unter Zusatz von Zuckeralkoholen zur Konservierung der Antikörper

erwiesen. Handhabung und Auswertung des Antikörper-Chips sind einfach und schnell und bauen auf den Schritten eines Standard-Sandwich-ELISAs auf<sup>1</sup>.

Der Nachweis spezifisch gebundener BW-Agenzien erfolgt unter Verwendung biotinylierter Nachweisantikörper, die

inkubation mittels polymerisierter Streptavidin-Meerrettichperoxidase dient der Signalamplifikation. Zur kolorimetrischen Detektion spezifisch gebundener Antigene wird das präzipitierende 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat eingesetzt. Das Auslesen der prozessierten Antikörper-

Antikörper-System sind in Tabelle 1 aufgeführt und entsprechen weitgehend den Detektionsgrenzen gut etablierter und klassischer ELISAs. Die Grenzen sind dabei für die

Kennziffer 14 LW 03 · [www.biocom.de](http://www.biocom.de)