

Proteinchips für die Affinitäts-MALDI-TOF-Massenspektrometrie mittels gerichteter Immobilisierung von Proteinrezeptoren an Self-Assembled Monolayer aus Organosilanen

G. Tovar¹, C. Hoffmann¹, W. Bouschen², B. Spengler², H. Brunner¹

¹ Universität Stuttgart, Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart
Tel. 0711-9704038, Fax 0711-9704200

gto@igb.fhg.de

² Universität Giessen, Institut für Anorganische und Analytische Chemie,
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen, Tel: 0641-9934100, Fax: 0641-9934109
Registriernummer der Online-Anmeldung: 183

Vortrag

Für den Einsatz in der Mikro-Biotechnologie müssen Chip-Oberflächen mit möglichst dünnen funktionellen Schichten ausgerüstet werden. Zum einen brauchen bestimmte Oberflächen Schutz gegen eine unerwünschte Adsorption von Biomolekülen. Zum anderen sollen an Sensoroberflächen spezifische Biomoleküle immobilisiert werden und dort als molekulare Erkennungsstellen fungieren. Die Effektivität solcher molekularen Erkennungsreaktionen hängt sowohl von der Funktionalität als auch der Zugänglichkeit der Bindestellen ab [1]. *Self-Assembled Monolayer* (SAM) funktionalisieren Substrate als ultradünne Beschichtung für die Immobilisierung von Proteinen. Wir untersuchten die Funktionalisierung von Oxidoberflächen mittels Synthese und Umsetzung verschiedener Organosilanmoleküle sowohl für die gerichtete Bindung von Proteinen als auch für eine proteinabweisende Eigenschaft.

Proteinbindende Oberflächen wurden unter anderem durch die Umsetzung eines Nitrilotriessigsäurederivates (NTA) mit Epoxy-terminierten Silanen erzeugt. Die chemische Reaktion in der Monoschicht zu NTA-SAM wurde mit Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) verfolgt (Abb. 1) und die Schichtdicke ellipsometrisch zu $d = 1.2 \pm 0.3$ nm bestimmt.

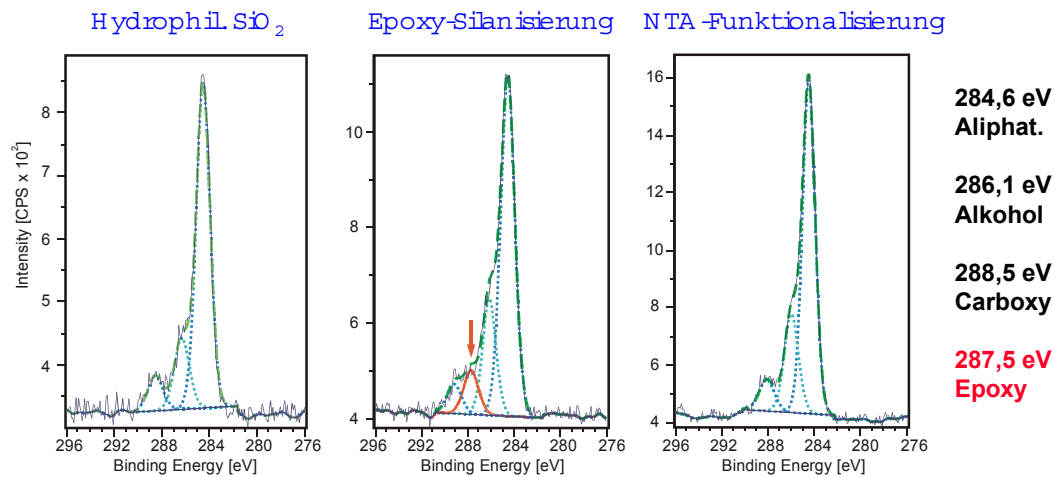
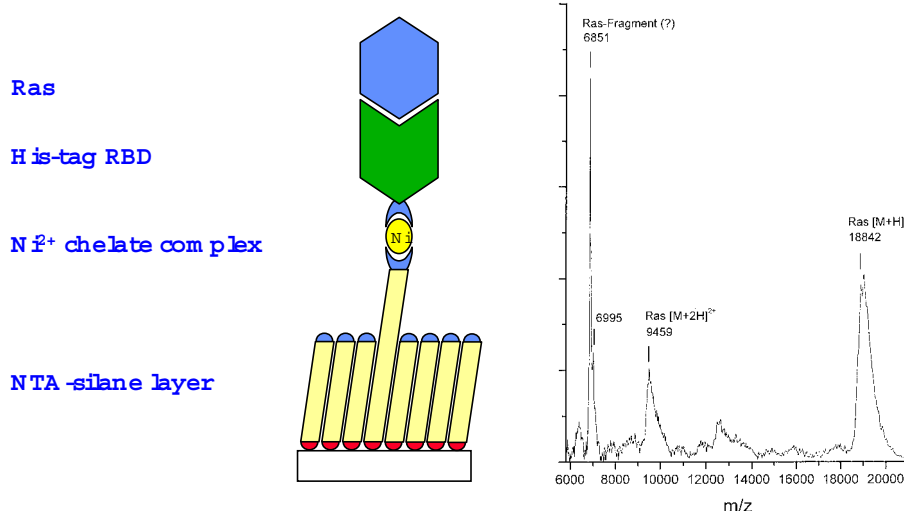


Abb. 1: Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) an funktionellen SAM. Die Kohlenstoff-C1s-Detailspektren zeigen die Einführung und chemische Umsetzung der Epoxyfunktion (roter Pfeil) an der Oberfläche.

In Gegenwart von Nickelionen wird aus der NTA-Gruppe und einem *His-tag* Protein ein gemischter Chelatkomplex gebildet und damit das Protein immobilisiert [2-5]. Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden am Modell des Proteins *Ras-Binding-Domain* (RBD) durchgeführt, ein Rezeptormolekül, welches direkt in der Krebsdiagnostik eingesetzt werden kann. Das RBD wurde im Forschungsverbund am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund modifiziert und zur Verfügung gestellt. Die Bindung von *His-Tag* RBD am NTA-SAM ergibt eine Dicke der Proteinschicht von $d = 2.4 \pm 0.4$ nm und entspricht damit der Stärke einer Protein-Monoschicht. Die Bindeaktivität für Ras-GTP wurde durch Verwendung des Protein-Chips als affines Substrat für MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen (Abb. 2).

Abb. 2: Schema des Proteinchips: Der NTA-SAM-gebundene Proteinrezeptor *His-Tag* RBD bindet seinen



Liganden Ras und präsentiert ihn für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie an der Chip-Oberfläche. Ras-Massensignale belegen die spezifische Ras-Bindung an der Oberfläche, in Blindproben ist kein Ras nachzuweisen.

Proteinabweisende Oberflächen wurden mit eigens synthetisierten Ethylenglycol-terminierten Silanen erzeugt. Ethylenglycol-terminierte Thiolat-SAM auf Gold reduzierten signifikant die unspezifische Bindung unterschiedlicher Proteine [3, 6]. Die präparierten Ethylenglycolsilan-SAM reduzierten die unspezifische Adsorption von Proteinen effektiv, wie an unterschiedlichen Modellproteinen gezeigt. Wurden die Ethylenglycolsilane während der SAM-Präparation um bis zu 20 % durch alkylterminierte Silane ersetzt, blieb die proteophobe Wirkung der Oberfläche erhalten. Durch Verwendung proteinbindender Silane zur Co-Immobilisierung mit Ethylenglycolsilanen können so optimierte Oberflächen erzeugt werden.

Die vorgestellten Arbeiten wurden im Teilprojekt „Immobilisierung von Biomolekülen als molekulare Rezeptoren (FKZ 0310993)“ eines BMBF-Verbundprojektes durchgeführt.

Literatur:

- [1] Rao, S.V., Anderson, K.W., Bachas, L.G., *Mikrochim. Acta*, **1998**, 128, 127-143.
- [2] Dietrich, C., Schmitt, L., Tampe, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, 92, 9014-9018.
- [3] Sigal, G.B., Bamdad, C., Barberis, A., Strominger, J., Whitesides, G.M., *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 490-497.
- [4] Liley, M., Keller, T.A., Duschl, C., Vogel, H., *Langmuir*, **1997**, 13, 4190-4192.
- [5] Schmid, E.L., Keller, T.A., Dienes, Z., Vogel, H., *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 1979-1985.
- [6] Harder, P., Grunze, M., Dahint, R., Whitesides, G.M., Laibinis, P.E., *J. Phys. Chem. B*, **1998**, 102, 426-436.