

A collection of red, textured spheres of various sizes scattered across the top half of the page. Some spheres are in sharp focus, while others are blurred, creating a sense of depth. They appear to be floating or falling against a light gray background.

Multiplexe Analytik mit Bead-basierten Assays

PROGEN Biotechnik

Vertrieb und Produktmanagement

PROGEN Biotechnik GmbH

Maaßstr. 30 | 69123 Heidelberg | Deutschland

Telefon +49 (0) 6221 82 78 - 0

Telefax +49 (0) 6221 82 78 23

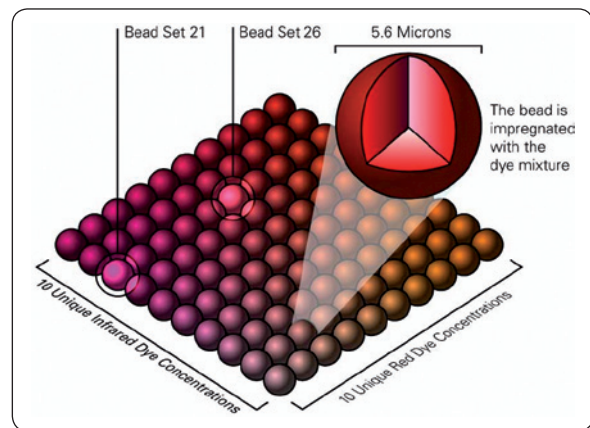
info@progen.de | www.progen.de



Das Prinzip

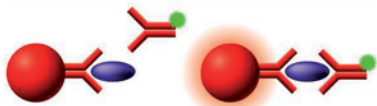


Multiparameter-Testsysteme von Multimetrix basieren auf der Luminex-xMAP-Technologie und erlauben die simultane Quantifizierung von bis zu einhundert verschiedenen analytischen Parametern in einer einzigen Probe. Das Ergebnis dieser multiplexen Messungen sind Multiparameter-Profile. Im Vergleich zu herkömmlichen Testsystemen bieten derartige Profile eine deutlich erhöhte analytische Aussagekraft. Durch den einfach zu handhabenden und vollautomatischen Ablauf der Messung ergibt sich eine Material-, Kosten- und Zeitersparnis, selbst im Vergleich zur Bestimmung nur eines einzigen Parameters unter Anwendung herkömmlicher Verfahren. Grundlage der Technologie sind mikroskopisch kleine sphärische Polystyrolpartikel, so genannte Mikrosphären oder Beads, die analog zu ELISA und Western Blot als Festphase für biochemische Nachweisreaktionen dienen. Es sind derzeit einhundert verschiedene Mikrosphären-Typen verfügbar, die sich in ihrem Fluoreszenzfarbton unterscheiden und von denen jeder ein eigenes spezifisches Nachweisreagenz auf der Oberfläche trägt. Auf diese Weise können bis zu einhundert verschiedene



Nachweisreaktionen in einem sehr geringen Probenvolumen simultan durchgeführt werden. Durch die große Flexibilität der Multiplexen Bead Arrays sind grundsätzlich alle denkbaren Parameter messbar, die durch eine spezifische Interaktion zweier definierter biochemischer Verbindungen nachweisbar sind:

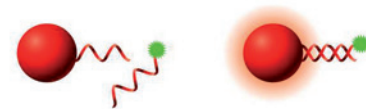
Immunoassay



Enzyme Assay



Nucleic Acid Assay



Receptor-Ligand





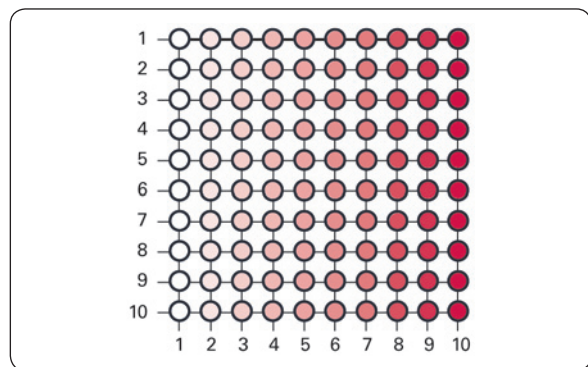
Die Technologie

Klassifizierung – Bindung von Analyten – Detektion gebundener Analyten



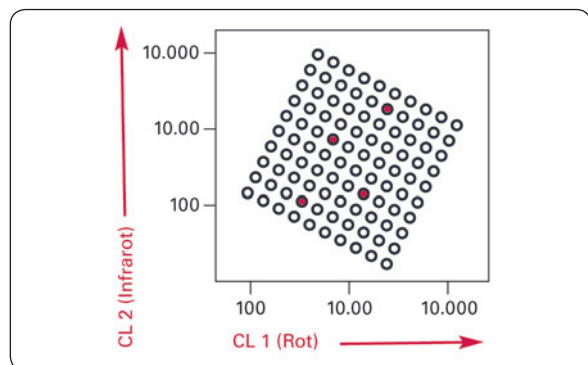
Klassifizierung

Die Mikrosphären sind mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen (Rot und Infrarot) gefärbt, die in unterschiedlichen Bereichen des optischen Spektrums emittieren. Die Kombination dieser beiden Farbstoffe in jeweils zehn verschiedenen Konzentrationsstufen führt zu einhundert spektral unterscheidbaren Schattierungen von Rot und Infrarot. Jede der daraus resultierenden Fluoreszenzintensitäten definiert eine Population von Mikrosphären (Beadregion). Die Beadregionen sind die Basis für das multiplexe Testformat, wobei jede Region einen definierten Einzeltest repräsentiert. Diese Fluoreszenzkodierung der Mikrosphären ist die Grundlage für ihre Erkennung durch das Analysegerät und ihre exakte Zuordnung zu ihrer jeweiligen Population.



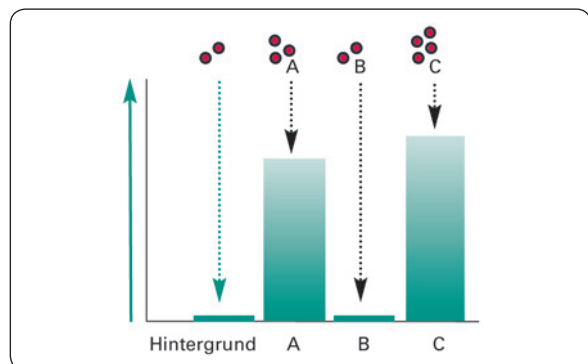
Bindung von Analyten

Jeder Testkit enthält einen so genannten Bead-Mix (Mischung unterschiedlich gefärbter und beschichteter Bead-Populationen). Dieser wird mit der Probe inkubiert, was zur Bindung der jeweils molekular komplementären Reaktionspartner (Analyten) führt. Je höher die Konzentration des entsprechenden Analyten in der Probe ist, desto mehr wird davon gebunden. Da die Mikrosphären aufgrund ihrer unterschiedlichen Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen eindeutig klassifiziert werden können, ist es möglich, simultan bis zu einhundert verschiedene Analyten quantitativ nachzuweisen.



Detektion gebundener Analyten

Der spezifische Nachweis der Bindung von Analyten an die Mikrosphären erfolgt über ein Detektionsmolekül (Konjugat). Dieses Konjugat hat eine hohe spezifische Affinität zum Analyten und ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Phycoerythrin) gekoppelt, der im Wellenlängenbereich des grünen Lichtes emittiert. Dieser spektrale Bereich unterscheidet sich von denen der internen Farbstoffe, so dass die Klassifizierung der Mikrosphären und die Quantifizierung des Analyten nebeneinander durchgeführt werden können.





Die Technologie

Probenaufnahme und hydrodynamische Fokussierung – Optische Bank

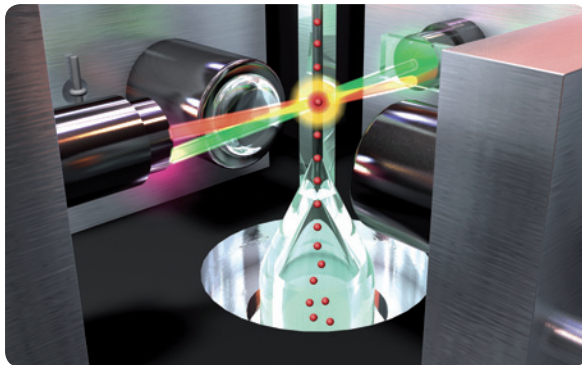


Die Analyse und Auswertung der Bead-basierten Assays erfolgt mit dem Luminex-Analysesystem. Dieses basiert auf der Methode der Durchflusszytometrie unter Verwendung zweier unterschiedlicher Laser. Durch Verwendung der sogenannten XY-Plattform können Proben vollautomatisch im 96-well-Format abgearbeitet werden.



Probenaufnahme und hydrodynamische Fokussierung

Die Probe wird über eine Kolbenpumpe aus einer Mikrotiterplatte entnommen und zur Messküvette geleitet. Die Mikrosphären werden während der Injektion in die Messküvette mit einer Mantelflüssigkeit (Sheath Fluid) umspült, so dass zwischen dem fokussierten Probenstrahl und der Mantelflüssigkeit eine wirbelfreie Strömung gewährleistet ist. Durch diese hydrodynamische Fokussierung werden die Mikrosphären vereinzelt und präzise durch den Fokus des Laser-basierten Detektionssystems geführt



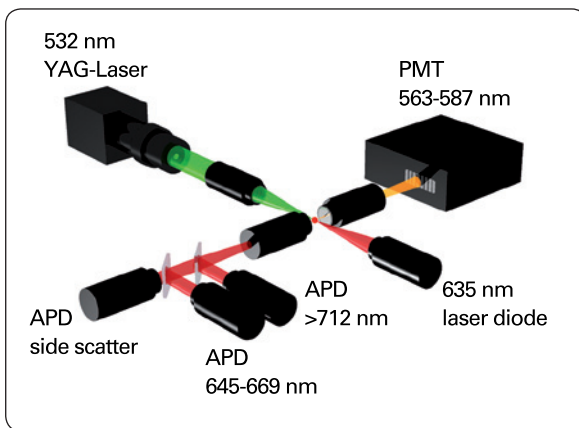
Optische Bank

In der optischen Bank sind zwei Festkörperlaser installiert. Diese dienen einerseits der Klassifizierung der Mikrosphären und andererseits dem quantitativen Nachweis der gebundenen Konjugat-Moleküle. Das Licht beider Laser ist auf den fokussierten Partikelstrahl in der Messküvette gerichtet. Senkrecht zur Eintrittsrichtung des Laserlichts wird das emittierte Fluoreszenzlicht über Spiegel und Filter auf die entsprechenden Detektoren geleitet.



Die Optik

Klassifizierung – Quantifizierung – Signalverarbeitung



Klassifizierung

Die Klassifizierung der Mikrosphären erfolgt durch eine Laserdiode (633 nm). Das Licht dieser Laserdiode regt die in den Mikrosphären inkorporierten Fluoreszenzfarbstoffe an. Die Farbstoffe emittieren in den Wellenlängenbereichen 645 bis 669 nm und >712 nm. Das emittierte Licht wird über Spiegel und Filter auf die zugehörigen Avalanche-Photodioden (APD) geleitet.

Das Signalverhältnis an den beiden Photodioden ist die Grundlage für die Zuordnung der Mikrosphären zu ihrer jeweiligen Population. Das Licht der Laserdiode wird zusätzlich zur Klassifizierung auch noch zur Bestimmung der Partikelgröße mittels Seitwärtslichtstreuung genutzt. Die Seitwärtslichtstreuung wird

ebenfalls mit einer Avalanche-Photodiode gemessen. Durch Berücksichtigung der Seitwärtslichtstreuung kann verhindert werden, dass Bead-Aggregate (z.B. Dubletten) oder andere fluoreszierende Verunreinigungen in das Analyseergebnis eingehen.

Quantifizierung

Zur Quantifizierung des Analyten wird ein Yttrium-Argon-Germanium-Festkörperlaser (532 nm) verwendet, der den Fluoreszenzfarbstoff des Konjugat-Moleküls anregt. Die Intensität des emittierten Lichtes ist proportional zur gebundenen Analytenmenge. Zur Erhöhung der Sensitivität wird hier für die Signalverarbeitung ein Photomultiplier (PMT) verwendet. Die Markierung des Konjugats erfolgt durch Fluoreszenzfarbstoffe, die im Wellenlängenbereich zwischen 563 und 587 nm emittieren.

Signalverarbeitung

Die Photodioden (Klassifizierung, Größenausschluss) und der Photomultiplier (Quantifizierung) empfangen das Fluoreszenzlicht der Mikrosphären. Im Analysegerät werden die Signale digitalisiert und an den Signalprozessor geleitet. Der Prozessor verstärkt und verarbeitet die angefallenen Messwerte. Das Luminex-Analysesystem kann bis zu 20.000 Messereignisse pro Sekunde verarbeiten.



Multiplexe Nachweisreaktionen



Die Multiplex-Testsysteme enthalten eine Mischung verschiedener Mikrosphärenpopulationen (Bead-Mix). Jede dieser Populationen ist definiert durch einen individuellen roten Fluoreszenzfarbton und eine Beschichtung mit einem spezifischen Capture-Reagenz, hier beispielhaft mit A, B und C bezeichnet.

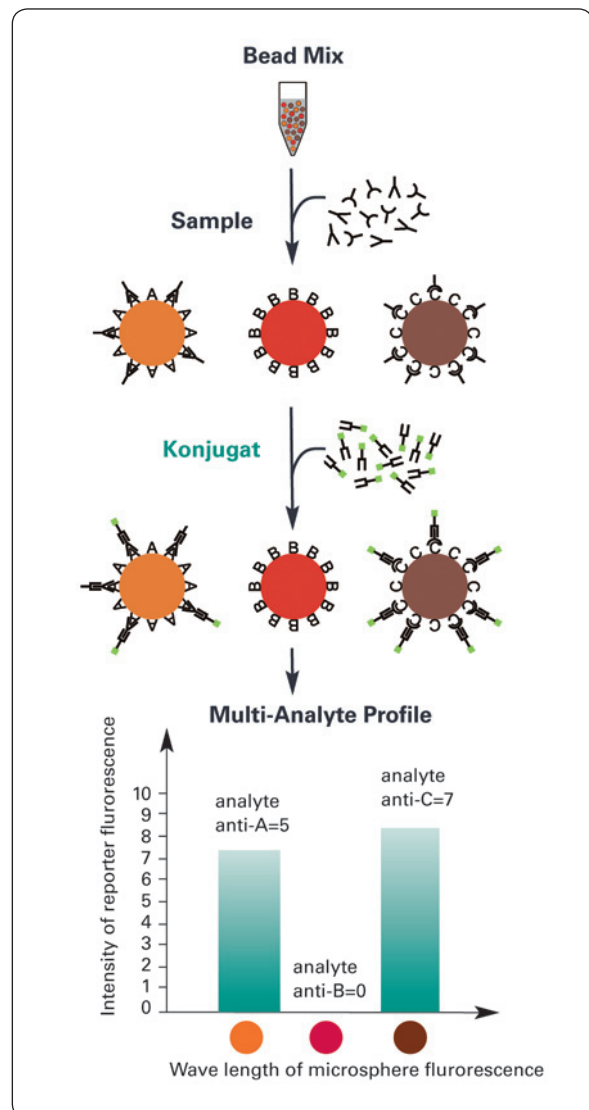
Bei Inkubation mit wenigen Mikrolitern einer flüssigen Probe (z.B. Serum) bindet jede Beadpopulation ihr spezifisches Zielmolekül (Analyt). Diejenigen Analyten, die auf der Oberfläche der Mikrosphären gebunden sind, können mit einem spezifischen grünen Fluoreszenzmarker (Konjugat) eingefärbt werden.

Im Luminex-Analysesystem werden die Mikrosphären bezüglich ihrer roten (Bead-Klassifizierung) und grünen (Quantifizierung) Fluoreszenz individuell analysiert. Die Ergebnisse der multiplexen Nachweisreaktionen werden im Analysegerät vollautomatisch ausgewertet.

Das Resultat sind Multi-Analyten-Profile mit deutlich erhöhter analytischer Aussagekraft im Vergleich zu einem Einzeltest.

Bead-basierte Assays sind besonders geeignet für Hochdurchsatzanwendungen in den Bereichen:

- Labordiagnostik
- Pharmakologisches Screening
- Qualitätskontrolle
- Expressions-Profilig
- SNP-Analytik





Die Vorteile



Bead-basierte Assays vereinigen die Sensitivität von ELISAs mit der Spezifität von Western Blots. Weitere entscheidende Vorteile sind die exakte Quantifizierbarkeit sowie die vollautomatische Messung und Auswertung der Messdaten im Analysesystem.

Das ist neu!

- Der Einsatz von Fluoreszenz zusammen mit der Multiplexfähigkeit ermöglicht die hochsensitive, simultane Quantifizierung mehrerer Analyten in sehr geringen Probenvolumina.
- Die Kombination verschiedener Messbereiche und Nachweisprinzipien für parallel gemessene Analyten in dem selben Test sind Beispiele für die hohe analytische Flexibilität von Fluoreszenten Bead Arrays.
- Die hydrophilen Trägeroberflächen der Mikrosphären und eine vernachlässigbare unspezifische Bindung gestatten die Durchführung immunologischer Tests mit exzellenten Signal-Rausch-Verhältnissen und niedrigsten Nachweisgrenzen.
- Multiparameter-Testsysteme auf Basis der Lumineszenz-Technologie sind ohne großen technischen Aufwand automatisierbar.

1. Exakte Quantifizierung

2. Hohe Sensitivität und Spezifität

3. Multiplex- Analytik

4. Automatisierbarkeit

Durch die Kombination dieser Charakteristika bieten Bead-basierte Testsysteme höchste Präzision und Effizienz bei gleichzeitiger Kostenersparnis.



Produkte und Service



Wir entwickeln multiplexe Reagenzien-Kits für diagnostische und bioanalytische Anwendungen.

Darüber hinaus testen wir Proben im Kundenauftrag und entwickeln maßgeschneiderte Lösungen für spezifische Fragestellungen auf Anfrage.

Das Luminex-Analysesystem und ein umfangreiches Produktsortiment Bead-basierter Assays für Anwendungen in Diagnostik und Forschung ist über unseren kompetenten Vertriebspartner PROGEN Biotechnik GmbH erhältlich:

- Nachweis von Infektionserkrankungen
- Nachweis von Zytokinen, Chemokinen und Matrixmetalloproteinasen
- Quantitative Genexpressionsanalyse
- HPV-Genotypisierung

MULTIMETRIX

Testservice, Entwicklung und Produktion

Multimetrix GmbH
Maaßstraße 30
69123 Heidelberg
Deutschland

Telefon +49 (0) 6221 75 20 6 - 0
Telefax +49 (0) 6221 75 20 6 - 28

info@multimetrix.com
www.multimetrix.com

PROGEN Biotechnik

Technischer Service und Vertrieb

PROGEN Biotechnik GmbH
Maaßstraße 30
69123 Heidelberg
Deutschland

Telefon +49 (0) 6221 82 78 - 0
Telefax +49 (0) 6221 82 78 - 23

info@progen.de
www.progen.de