

Bruk av immuno-PCR i veterinærmedisinsk diagnostikk

KJETIL BÅRDSSEN¹, SIV MELING¹, ELI BRUNDTLAND¹ OG MARTHA J. ULVUND¹

Seksjon for småfeforskning og dyrehelse /Norges veterinærhøgskole¹

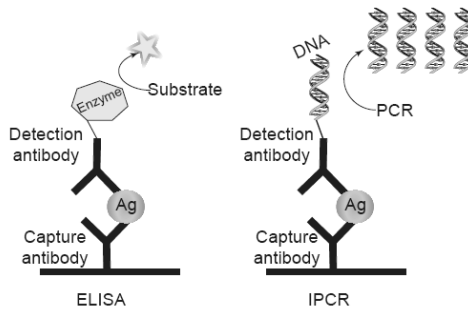
Introduksjon

Polymerase chain reaction (PCR) er i dag en av de mest anvendte metoder innen molekylærbiologi. PCR er en rask og robust metode som på grunn av sin effektive amplifisering tillater deteksjon av små mengder RNA og DNA. Introduksjon av real-time PCR har gjort PCR til en metode med et stort dynamisk deteksjonsområde og et ideelt verktøy for kvantitative analyser. I mange tilfeller vil det imidlertid være mer anvendelig å detektere proteiner i stedet for nuklein syrer. De fleste levende prosesser er styrt av og involverer proteiner, og tidlig diagnostikk av ulike sykdommer, samt deteksjon av lavt uttrykte biomarkører, stiller høye krav til sensitiv deteksjon.

Fra immunoassay til immuno-PCR

Teknikker basert på immunoassay benytter seg av spesifikke antistoff-antigen interaksjoner. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) har siden 1960-årene vært et standard immunoassay for deteksjon av proteiner. Fordelene med denne typen antistoffbaserte metoder er den store variasjonen av antigener som antistoffene kan dirigeres mot, og at antistoffene vil binde seg med stor spesifisitet til sine epitoper. Ulike applikasjoner av ELISA inkluderer direkte, indirekte og sandwich assays. Sandwich ELISA er basert på at et antistoff festes til overflaten i en brønn på et ELISA-brett (Figur 1). Antigenet vil bindes til antistoffet, og et nytt antistoff rettet mot en annen epitop på samme antigen brukes til påvisning. Deteksjonsantistoffet er linket til et enzym, og en kromogen reaksjon vil indikere om antigenet er tilstede eller ikke. Resultatet av den kromogene reaksjonen er relatert til mengden antigen som er til stede og kan kvantiteres. Den enzymatiske reaksjonen vil gi et sterkere signal over tid, og dette er med på å øke sensitiviteten i deteksjonen.

IPCR ble introdusert av Sano og medarbeidere i 1992 (Sano *et al.* 1992) og er basert på en form for ELISA, men i stedet for å forbinde deteksjonen til en enzymatisk reaksjon, brukes en DNA markør (Figur 1). Det som er viktig, og ofte vanskelig, er å få en god og spesifikk kobling av DNA markøren til deteksjonsantistoffet. Ulike måter har vært benyttet, og eksempler på disse er:



Figur 1. Skjematisk sammenligning av ELISA og IPCR. Bruk av en DNA markør i stedet for et antistoff-enzym konjugat gjør det mulig å detektere små mengder antigen (Ag) (Modifisert fra Niemeyer *et al.* 2005).

i) biomimetisk linking (ligering), ii) kjemisk kryss-linking (kvalent binding) eller iii) *in situ* kopling vha. streptavidin (Adler *et al.* 2008). DNA markøren kan amplifiseres i en real-time PCR analyse og kvantiteres i en såkalt immuno-kvantitativ PCR (iqPCR). Mengden av PCR amplicon som produseres vil være proporsjonal til den initiale mengden antigen som skal detekteres (Niemeyer *et al.* 2005). På denne måten benyttes spesifisiteten fra tradisjonelle immunoassays, samtidig som molekylærbiologisk metodikk bidrar til økt sensitivitet. Flere studier har vist en 100-10 000 ganger økt sensitivitet ved bruk av immuno-PCR sammenlignet med ELISA (Niemeyer *et al.* 2005).

IPCR gir en forbedret deteksjonsgrense (level of detection, LOD), benytter mindre prøvevolum, og er kompatibel med ulike biologiske matriser. Disse egenskapene gjør IPCR til en velegnet metode for å studere ulike antigener i forskjellige prøvematerialer, noe som også gjenspeiles i bruksområdene man har sett for metoden. IPCR har vært benyttet til deteksjon av cytokiner (Saito *et al.* 1999; Furuya *et al.* 2000), bakterier som for eksempel *Salmonella* (Baumler *et al.* 1997) og *Clostridium* (Wolfhagen *et al.* 1994) og deres toksiner (Wu *et al.* 2001), bovin herpesvirus I (Mweene *et al.* 1996) og en rekke andre proteiner, inkludert angiotensinogen (Sugawara *et al.* 2000), bovin serum albumin (Sano *et al.* 1992) og IgG fra ulike arter (Adler *et al.* 2003). Metodens brede anvendelsesområde og sensitivitet gjør den derfor til en meget interessant metode for bruk innen veterinærmedisinsk diagnostikk og forskning, f.eks. innen årsaks- og patogenesestudier av mange forskjellige sjukdommer.

Immuno-PCR deteksjon av prion protein

Prionsykdom forårsakes av at et protein, prionprotein, som er uttrykt hos pattedyr og andre vertebrater, endrer form fra et normalfungerende protein (PrP^C) til en sykdomsfremmende form (PrP^{Sc}). I dag finnes det ingen tilgjengelig praktisk metode for preklinisk diagnostikk av prionsykdom hos dyr eller mennesker. Det er derfor et behov for sensitive og spesifikke metoder for deteksjon PrP^{Sc}, og/eller

andre biomarkører, for preklinisk diagnostikk av denne typen sykdommer. Et fåtall studier har til nå benyttet IPCR til deteksjon av PrP^{Sc} i hjernevev fra mus eller hamster med eksperimentell prionsykdom (Gofflot *et al.* 2004; Barletta *et al.* 2005; Gofflot *et al.* 2005).

Seksjon for småfeforskning ved Norges veterinærhøgskole har for øyeblikket et NFR prosjekt med tittel: "Preklinisk diagnostikk av prionsykdom". Hoveddelen i prosjektet går på deteksjon av sykdomsassosierte biomarkører for scrapie hos sau ved hjelp av proteomikk. Vi vil benytte IPCR for deteksjon av PrP^{Sc} i ulike typer vev og til påvisning av nye biomarkører for prionsykdom. Arbeid pågår nå med etablering og optimalisering av denne teknikken, dette er til dels vanskelig og krever erfaring fra både ELISA og real-time PCR. Preliminære resultater indikerer en mer sensitiv deteksjon av rekombinant prion protein (rPrP).

Referanser

- Adler, M., *et al.* (2003). "A real-time immuno-PCR assay for routine ultrasensitive quantification of proteins." *Biochem Biophys Res Commun* 308(2): 240-50.
- Adler, M., *et al.* (2008). "Sensitivity by combination: immuno-PCR and related technologies." *Analyst* 133(6): 702-18.
- Barletta, J. M., *et al.* (2005). "Detection of ultra-low levels of pathologic prion protein in scrapie infected hamster brain homogenates using real-time immuno-PCR." *J Virol Methods* 127(2): 154-64.
- Baumler, A. J., *et al.* (1997). "Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*." *J Clin Microbiol* 35(5): 1224-30.
- Furuya, D., *et al.* (2000). "An immuno-polymerase chain reaction assay for human interleukin-18." *J Immunol Methods* 238(1-2): 173-80.
- Gofflot, S., *et al.* (2005). "Immunoquantitative PCR for prion protein detection in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease." *Clin Chem* 51(9): 1605-11.
- Gofflot, S., *et al.* (2004). "Immuno-quantitative polymerase chain reaction for detection and quantitation of prion protein." *J Immunoassay Immunochem* 25(3): 241-58.
- Mweene, A. S., *et al.* (1996). "Development of immuno-PCR for diagnosis of bovine herpesvirus 1 infection." *J Clin Microbiol* 34(3): 748-50.
- Niemeyer, C. M., *et al.* (2005). "Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification." *Trends Biotechnol* 23(4): 208-16.

Saito, K., et al. (1999). "Detection of human serum tumor necrosis factor-alpha in healthy donors, using a highly sensitive immuno-PCR assay." *Clin Chem* 45(5): 665-9.

Sano, T., et al. (1992). "Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates." *Science* 258(5079): 120-2.

Sugawara, K., et al. (2000). "A highly sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for human angiotensinogen using the identical first and second polyclonal antibodies." *Clin Chim Acta* 299(1-2): 45-54.

Wolffhagen, M. J., et al. (1994). "Rapid detection of toxigenic *Clostridium difficile* in fecal samples by magnetic immuno PCR assay." *J Clin Microbiol* 32(7): 1629-33.

Wu, H. C., et al. (2001). "Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A using immuno-PCR." *Lett Appl Microbiol* 32(5): 321-5.