

Hybridisierungskinetiken von Oligo- und Polynukleotiden an Glas-Oberflächen

Susanne Schwonbeck*, W. Meinel**, H. Glatt**, F. F. Bier*

*Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik, AG Molekulare Bioanalytik

Arthur-Scheunert-Allee 114-116, 14558 Bergholz-Rehbrücke,

** Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Abteilung Ernährungstoxikologie

Arthur-Scheunert-Allee 114-116, 14558 Bergholz-Rehbrücke,

Registriernummer der Online-Anmeldung: 201

Poster

Cytosolische Sulfotransferasen katalysieren den Transfer der Sulfonatgruppe auf endogene Verbindungen wie z.B. Steroide oder Katecholamine sowie auf Xenobiotika. Die Sulfonierung bestimmter Substanzen führt abhängig von deren Struktur jedoch zur Bildung reaktiver, mutagener and carcinogener Metaboliten. Im SULT1A1-Gen wurden Punktmutationen ("Single-Nucleotide-Polymorphisms", SNPs) identifiziert, die zu Aminosäureaustausch führen. Der am häufigsten vorkommende Austausch G638A führt zu den beiden Alloenzymen SULT1A1*Arg213 und *His213. Diese Alloenzyme unterscheiden sich in vitro erheblich in ihrem Potential zur Bioaktivierung bei vielen getesteten Substanzen. Darüberhinaus wurde eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der weniger aktiven *His213 Variante und Übergewicht gefunden. Um mögliche Assoziationen zwischen Krankheitsbildern und bestimmten SULT1A1 Genotypen feststellen zu können, ist eine Untersuchungsmethode notwendig, bei der in kurzer Zeit der Genotyp möglichst vieler Probanden ermittelt werden kann. Daher soll anhand des Modells der humanen Sulfotransferase SULT1A1 der Einfluß von Punktmutationen auf das Hybridisierungsverhalten von Oligo- und Polynukleotiden untersucht werden. Diese Untersuchungen dienen als Vorversuche für die Etablierung und Automatisierung der SNP-Analyse auf DNA-Chips, die den gewünschten Probendurchsatz ermöglichen soll.

Die SNP-Analyse erfolgt mittels Glasfaser-Optik. Auf einer streptavidinbeschichteten Glasfaser-Oberfläche ist ein 13 Bp langes Oligonukleotid - der SNP und 12 flankierende Nukleotide - über Biotin immobilisiert. Nach Zugabe eines mit Fluorescein gelabelten Proben-Amplifikats findet die Hybridisierung am 13mer statt. Anschließend wird durch Spülen mit Puffer die Dissoziation des Polynukleotids ausgelöst. Anhand des emittierten Fluoreszenz-Signals kann die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Dissoziation bestimmt werden.

Es konnte gezeigt werden, daß sich die Dissoziationsgeschwindigkeit eines mis-match (Bsp. Mutante - Wildtyp) wesentlich von der eines full-match (Bsp. Mutante - Mutante) unterscheidet. Es ist somit möglich, anhand der Dissoziationskinetik Mutante und Wildtyp eines SNP-haltigen DNA-Abschnitts zu identifizieren.