

Entwicklung eines DNA-Array-Chips mit elektrochemischer Detektion

Eric Nebling, Thomas Grunwald, Jörg Albers, Rainer Hintsche

Fraunhofer Institut für Siliziumtechnologie (ISIT), Fraunhoferstraße 1, D-25524 Itzehoe

Tel.: 04821-174312

nebling@isit.fhg.de www.isit.fhg.de

Registriernummer der Online-Anmeldung: 150

Vortrag

Die DNA-Analyse und Sequenzierung mittels sogenannter DNA-Chips ist in den letzten Jahren zu einer weit verbreiteten Anwendung geworden. Hierbei wird in erster Linie optisch detektiert (Fluoreszenz), aber auch elektrochemische Detektionsverfahren sind in der Erprobung [1]. Der apparative Aufwand für die optische Detektion ist hoch und eine quantitative Auslesung der Chips ist kaum möglich. Das Prinzip des Redox-Recyclings mit interdigitalen sub- μm -Elektrodenarrays (IDAs) stellt eine gute elektrochemische Detektionsmöglichkeit dar [2].

Wir haben in Siliziumtechnologie IDAs mit 28 separaten Positionen hergestellt. Die IDAs (1,0 μm Fingerbreite; 0,8 μm Abstand) einer Position haben einen Durchmesser von 200 μm und sind im Abstand von 300 μm angeordnet. Als Passivierung wurde Siliziumoxinitrit verwendet und um jede Position wurden polymere Ringstrukturen (SU8) photolithographisch aufgebracht (siehe Abb.1).

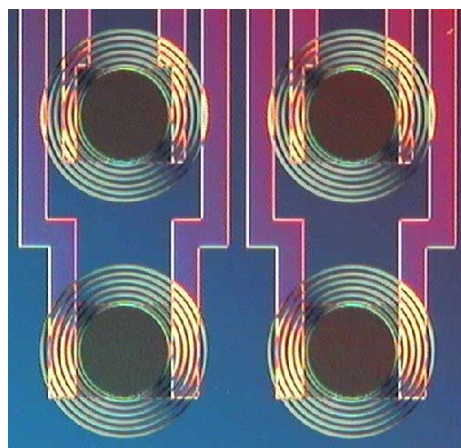


Abb.1: Ausschnitt von 4 Positionen eines DNA-Array-Chips

Der Nachweis der Tumormarker-CK20-DNA mit diesen Arrays wurde als Testsystem etabliert. Die Arraypositionen wurden selektiv mit CK20-Fänger-Oligonucleotiden (Match) und alternativ mit nichtbindender ribosomaler 16S-Fänger-DNA (Mismatch) beladen. Die Beladungstechnik nutzt Dosierkapillaren für wenige nl Reaktionslösung pro Arrayposition, wobei die SU8-Ringe ein Vermischen der Oligonucleotid-Lösungen wirksam verhindern. Die Fänger-Oligonucleotide wurden im Gemisch mit einem Verdünner (Mercaptohexanol) über Mercaptohexylreste mittels Thiol-Gold-Kopplung monomolekular an die Goldelektroden der jeweiligen Positionen gebunden. Auf den gesamten Chip wurde Analytlösung mit biotinylierter CK20-Ziel-DNA gegeben, die nur auf den CK20-bindenden Arraypositionen hybridisierte. Eine Enzym-Markierung der Hybride wurde mit einem Extravidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat erreicht. Damit kann nur auf den hybridisierten Positionen das Substrat p-Aminophenylphosphat enzymatisch in das elektrochemisch aktive, redox-recycling-fähige p-Aminophenol umgewandelt werden. Das elektrische Signal positiver Positionen zeigt einen zur gebundenen Enzymmenge proportionalen Stromanstieg.

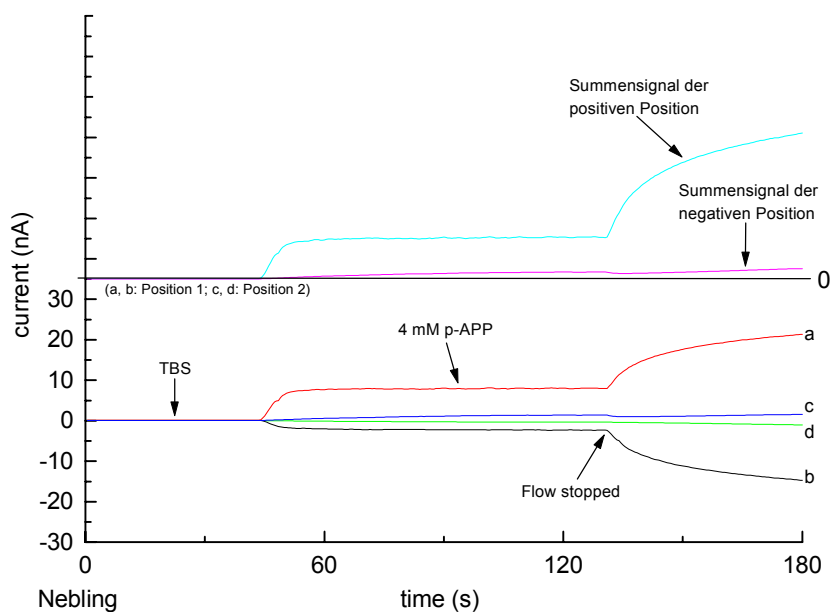


Abb.2: DNA-Assay auf zwei 200 μm -Positionen eines SIBANAT-Test-Chips (ISIT-Layout)

Das als Durchflußzelle gestaltete Detektionselement zeigte sowohl im Flow als auch im stopped Flow nur an positiven Positionen ein quantifizierbares Stromsignal (siehe Abb.2). Übersprechen der Signale (Enzymprodukte) auf nichtbindende Positionen und unspezifische Enzymbindungen wurden nicht beobachtet.

Die Zeit für die elektrochemische Detektion erfordert inklusive Wasch- und Äquilibrationsschritt nur 3 Minuten.

Literatur

- [1] Kelley, S. O., Boon, E. M., Barton, J. K., Jackson, N. M. and Hill, M. G. (1999) *Nucleic Acid Research*, **27**, 4830
- [2] Hintsche, R., Paeschke, M., Wollenberger, U., Schnackenberg, U., Wagner, B. und Lisec, T. (1994) *Biosensors & Bioelectronics*, **9**, 697

Diese Arbeit wurde im Rahmen des BMBF-geförderten Verbundprojekts SIBANAT durchgeführt.