

Markierungsfreie online-Detektion der Hybridisierung auf einem DNA-Chip – Detektionsmethode für den Gensensor

Alexander Jung, Kerstin Kröger, Cornelia Hänel, Oliver Birkert, Günter Gauglitz

Institut für Physikalische Chemie, Auf der Morgenstelle 8, 72076 Tübingen

Tel. 07071-29 74668

aj@ipc.uni-tuebingen.de

Registriernummer der Online-Anmeldung: 177

Vortrag

Die Genomforschung hat sich in den letzten Jahren verstärkt in Richtung neuer analytischer Methoden orientiert, um der großen Anzahl an notwendigen Experimenten durch parallele Ansätze zu begegnen. Der größte Entwicklungsschritt ist hierbei die Verwendung von sogenannten DNA-Chips, womit flächige Arrays aus immobilisierten DNA-Fragmenten beschrieben werden, die zu Anwendungen von der Expressionsanalytik (high density arrays) bis hin zu diagnostischen Chips (low density arrays) herangezogen werden.

Die Detektion auf Arrays erfolgt in kommerziellen Geräten in der Regel fast ausschließlich durch Fluoreszenzemission von farbstoffmarkierten Oligonukleotiden an der Oberfläche. In mehreren Beispielen wurde bereits die Detektion der Hybridisierung auf markierungsfreien Biosensoren, jedoch nur in Einkanalmessungen, gezeigt, wie z.B. auf SPR (Biacore), Gitterkoppler oder RlFS (Reflektometrische Interferenzspektroskopie). Diese oberflächenbasierten Detektionsmethoden erfordern keinerlei Markierung der zu detektierenden Komponenten, d.h. es kann im Einzelfall direkt mit Extrakten oder Amplifikaten aus komplexen Matrices heraus gearbeitet werden. Der Schritt der Farbstoffmarkierung entfällt und damit entfällt auch die mögliche Beeinflussung der Wechselwirkung durch die Markierung, genauso wie die Beeinflussung der Fluoreszenzintensität an der Oberfläche durch unspezifische Quenchingeffekte oder auch Photobleaching.

Im Bremer Forschungs- und Entwicklungsverbund Gensensorik wird mit dem Ziel einer industriellen Umsetzung des Gensensorik Konzeptes an einer Integration der DNA-Chiptechnologie in ein Gesamtkonzept aus Bioinformatik, biochemischer Fragestellung, Oberflächenchemie, Chipproduktion, Detektion und Datenauswertung/-bewertung gearbeitet. Im Rahmen dieses FuE Verbundes wird die parallele und zeitaufgelöste Detektion von Hybridisierungsreaktionen an der Oberfläche mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie auf das Chipformat übertragen.

Zeitabhängige Untersuchungen beinhalten dabei zusätzlich zur Endpunktsinformation auch kinetische Parameter von Assoziation und Dissoziation der Wechselwirkungspartner und damit eine genauere Möglichkeit zur Charakterisierung der Wechselwirkung und zur Kalibrierung. Detektiert man die online-Hybridisierung dabei markierungsfrei, kann eine Bindung nahezu beliebig lange beobachtet werden, ohne dass die Detektion durch Photobleachingeffekte beeinflusst oder limitiert würde.

Die Dichte an Fängeroligonukleotiden an der Oberfläche ist zur Detektion der Hybridisierung ein entscheidendes Qualitätskriterium. Ein weiteres ist die Minimierung unspezifischer Bindungen auf den Flächen zwischen den Detektionszentren (spots) auf dem Chip und auf "falschen" spots. Die zusätzliche Möglichkeit der Messung bei verschiedenen Temperaturen in Kombination mit einer geeigneten Immobilisierung der Fängersequenzen ermöglicht hier eine besondere Möglichkeit der Optimierung von Chipexperimenten.

Die Messung von Hybridisierungen auf Chips in einem Durchflusssystem ermöglicht es dabei, die Zeiten der Hybridisierung kurz zu halten, da keine Endpunktsbestimmung, sondern eine dynamische Messung von Assoziations- und Dissoziationsphase vorgenommen wird. Die Chips können für eine bestimmte Problemstellung, also eine bestimmte Kombination von Sequenzen an der Oberfläche vorkonfektioniert und dann für sehr viele Tests eingesetzt werden, da sie einfach regenerierbar und sehr stabil sind. Bei immobilisierter DNA können bis zu 60 Regenerationen der Oberfläche vorgenommen werden. Eine Alternative zur Immobilisierung von DNA auf dem Chip stellt die Verwendung von PNA dar. Hier werden noch höhere Hybridisierungskapazitäten, die bis zum Zehnfachen der Kapazität von DNA reichen können, erreicht, da die elektrostatische Abstoßung der DNA von der Oberfläche reduziert und die Affinität der DNA-PNA-Hybridisierung höher ist. Die Regenerationsstabilität dieser PNA-Arrays ist bis zu fünf mal besser als bei DNA-Oberflächen.

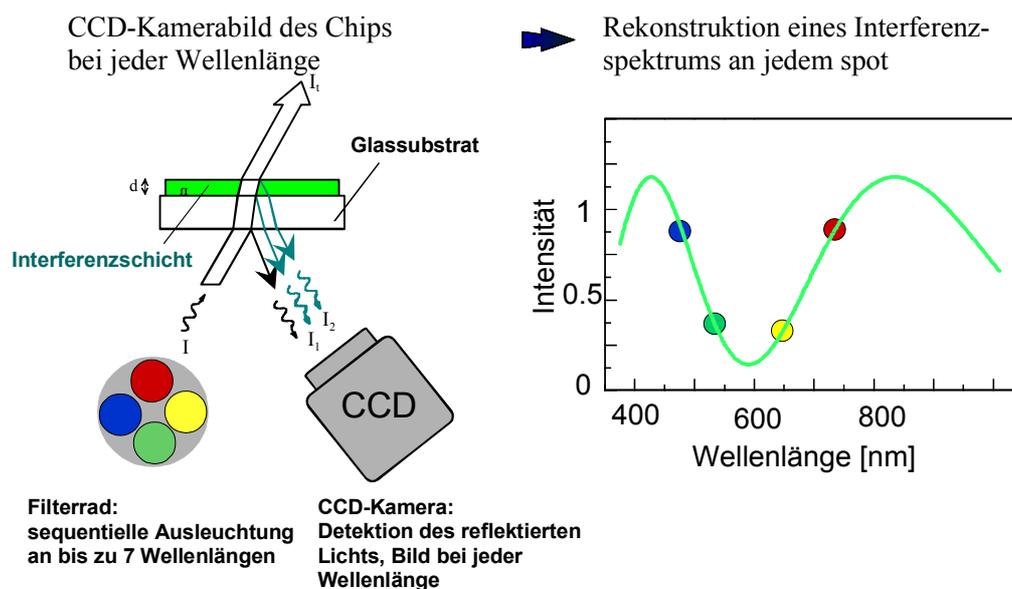


Fig.1: Prinzip der ortsaufgelösten RfS-Detektion mit einer CCD-Kamera

In den Experimenten wird ein miniaturisiertes RfS-System eingesetzt, das in der Lage ist, optische Schichtdickenänderungen auf einem Chip der Größe von ca. 1 cm² mit einer CCD Kamera zu

detektieren (Fig. 1). Die laterale Auflösung und die Größe der spots wird durch die eingesetzte Immobilisierungstechnik und die Oberflächenchemie auf ca. 250 µm/spot begrenzt. Eine integrierte Durchflußhybridisierungskammer ermöglicht dabei die Detektion im Durchfluß bei verschiedenen Temperaturen. Es werden parallele Messungen gezeigt, die an mehreren spots gleichzeitig und online Hybridisierungen detektieren. Die Experimente werden für DNA-Oberflächen und PNA-Oberflächen durchgeführt, die mit verschiedener Oberflächenchemie hergestellt wurden. Temperaturabhängige Effekte der online-Hybridisierung werden für verschiedene Sequenzen gezeigt.