

Neuer Biochipreader für Forschung & Entwicklung

H.-P. Lehr¹, G. Sulz¹, A. Brandenburg¹, J. Fuss¹, T. Liller¹, H. Liebhart¹, J. Kissling¹,
M. Reimann², H. Klapproth², R. Toder²

¹Fraunhofer-Institut für Physikalische Messtechnik IPM, Heidenhofstraße 8,
D-79110 Freiburg, Tel. 0761-8857 406, Lehr@ipm.fhg.de

²Genescan Europe AG, Engesserstr. 4b, D-79108 Freiburg

Registriernummer: 191

Vortrag

Die DNA-Chip-Technologie wird zunehmend für die Analyse von Nukleinsäuren eingesetzt [1]. Die Vorteile gegenüber herkömmlichen Methoden beruhen auf der Miniaturisierung, Parallelisierung, Kostenreduzierung und Zeitersparnis. Anwendungsgebiete sind die medizinische Diagnostik, Lebensmittel- und Umweltanalytik.

Das Analyseprinzip basiert auf der Paarung von komplementären DNA-Einzelsträngen.

Die Kenntnis der Sequenzabfolge eines Einzelstrangs erlaubt die Identifizierung des komplementären Partnerstrangs. Auf dem Chip sind punktrasterförmig Messpunkte angeordnet, die aus bekannten kovalent an die Oberfläche angebundenen DNA-Einzelsträngen, sog. DNA-Sonden bestehen. Verschiedene Messpunkten enthalten DNA-Sonden mit unterschiedlicher Sequenzabfolge. Wird auf das Messfeld eine flüssige Probe mit unbekanntem DNA-Einzelsträngen gegeben findet selektiv eine Anbindung (Hybridisierung) statt, falls Messpunkte komplementäre Bindungspartner in der Probe finden. Da die DNA Probe fluoreszenzmarkiert ist erlaubt die orts aufgelöste Messung der Fluoreszenzemission die Identifikation der DNA-Probe. Als Substratmaterial für Biochips werden Glasplättchen verwendet, auf denen bis zu einigen Tausend Messpunkte auf einer Fläche von 14 mm x 14 mm aufgetragen sind. Das Auftragen der DNA-Sonden erfolgt mit Nanoplottern, die kleine Flüssigkeitsvolumina mit einem Volumen von 1-2 nL dosieren und nach dem Eintrocknen Messpunkte mit einem Durchmesser von ungefähr 100-200 µm ergeben.

Eine Vielzahl optischer Analysegeräte für fluoreszenzmarkierte Biochips sind entwickelt worden und sind auf dem Markt erhältlich. Die Readertechnologie beschränkt sich gegenwärtig auf das optische Auslesen von Biochips nach abgeschlossener Hybridisierungsreaktion. Somit kann also nur der Endpunkt der Hybridisierung, aber nicht der Verlauf der Anbindung beobachtet werden. Dieses Verfahren ist besonders geeignet für Routineanwendungen mit festem Hybridisierungsprotokoll. Für

Forschung & Entwicklung ist die Untersuchung von Hybridisierungsverläufen und die schnelle Veränderung von Hybridisierungsparameter, wie z.B. Temperatur und Pufferkonzentration, von besonderem Interesse. Dies erfordert die Integration der bisher extern durchgeführten Hybridisierung in das optische Analysegerät.

Am Fraunhofer-Institut für Physikalische Messtechnik IPM ist ein neues optisches Analysegerät entwickelt worden, welches eine temperierbare Flusszelle für Hybridisierungsreaktionen mit einem Volumen von 40 μL und eine Pipettiereinheit für die automatische Befüllung und den Transport von Reagenzien besitzt. Zur Fluoreszenzanregung wird ein Halbleiterlaser verwendet, der bei einer Wellenlänge von 640 nm den aktiven Chipbereich von 2 cm^2 flächig ausleuchtet. Die Detektion des Emissionslichts bei 680 nm erfolgt mit einer hochempfindlichen gekühlten CCD-Kamera. Das System wird also abgestimmt auf DNA-Proben, die mit dem Farbstoff Cy5 markiert sind.

Als optische Messmethode dient die Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF), wie in Abbildung 1 dargestellt [2]. Sie ist besonders geeignet für die Untersuchung des Verlaufs von molekularen Vorgängen an der Grenzfläche zwischen einem festen und einem flüssigen Medium. Im Bereich der Grenzfläche bildet sich ein exponentiell abfallendes elektromagnetisches Feld aus, das einige hundert Nanometer in das optisch dünnere Medium reicht, aber keine Energie in dieses überführt. Dieses Feld bezeichnet man als Evaneszenzfeld. Befinden sich Fluoreszenzmoleküle in der Nähe der Grenzfläche, ist es jedoch möglich, dass diese vom Evaneszenzfeld angeregt werden und Fluoreszenzlicht emittieren. Fluoreszenzmoleküle, die sich nicht unmittelbar in der Nähe der Grenzfläche befinden, werden vom Evaneszenzfeld nicht erfaßt und daher auch nicht zur Fluoreszenz angeregt. Unter Ausnutzung dieses Phänomens kann das Zeit- und Temperaturverhalten der Hybridisierungsreaktion verfolgt werden, solange der Chip mit dem Hybridisierungsmedium aus markierten DNA-Molekülen in Kontakt steht. Hybridisierte DNA-Moleküle können so von nicht hybridisierten DNA-Molekülen, die sich frei im Flüssigkeitsvolumen bewegen, unterschieden werden. Außerdem sind Hybridisierungs / Denaturierungszyklen durchführbar, ohne den Chip austauschen zu müssen.

Biochips sind geeignet, um z.B. Mutationen im humanen Genom oder Verderber (Pathogene) in Lebensmittelprodukten zu detektieren. Für die Entwicklung der Chips ist die Optimierung der DNA-Sonden erforderlich, was bei herkömmlichen Biochipreadern mit hohem Aufwand an Reagenzien, Chipmaterial, Arbeitszeit und Personal verbunden ist. Der neue Biochipreader läßt eine Reduktion dieser Kostenfaktoren, die Beschleunigung und Verfeinerung der Chipentwicklung erwarten. In Abbildung 2 ist die Aufnahme von Schmelzkurven einer DNA-Probe (PCR-Produkt) eines Hämochromatosepatienten an gesunden (WT) und mutanten (MUT) DNA-Sonden (17-mer Oligonukleotide) dargestellt, die in Zusammenarbeit mit Genescan Europe AG durchgeführt wurden. Unterschiedliche Ablösungsverläufe sind erkennbar. Die Messungen haben gezeigt, dass der Biochipreader ein geeignetes Analysegerät für die Optimierung von DNA-Sonden ist.

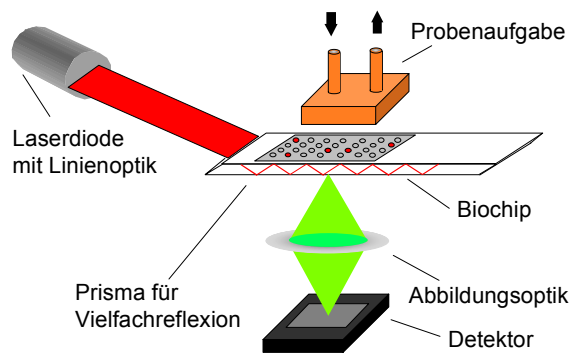


Abb.1: Schematischer TIRF-Aufbau

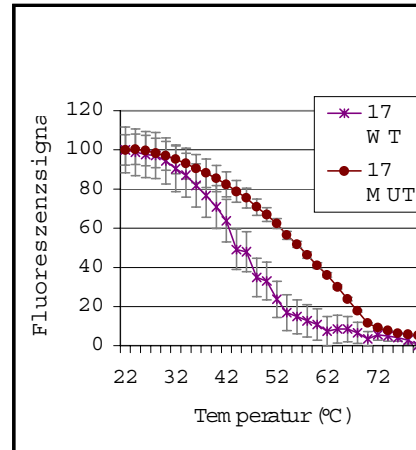


Abb.2: Schmelzkurven von DNA-Probe

Literatur

1. The chipping forecast, Nature genetics supplement, vol. 21, no. 1, Jan. 1999.
2. Total internal reflection fluorescence, D. Axelrod, T. P. Burghardt and N. L. Thompson, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 13 (1984).
3. Eine neue Generation Biochipreader für Forschung & Entwicklung, H.-P. Lehr, M.Reimann, A. Brandenburg, H. Klapproth, G. Sulz, J. Fuss, T. Liller, J. Weber, M. Stefan., Bioforum 23(2000), 204-207, GIT Verlag.

Danksagung

Diese Arbeiten wurden durchgeführt mit der finanziellen Unterstützung des Ministeriums für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg,

Förderkennzeichen: Nr. 720.430-21/3