

DNA-Sequenzauswahl und ihr Einfluss auf die Hybridisierung auf SPR-Mikroarrays

Alfred Kick¹ und Michael Mertig^{1,2}

¹Professur für Physikalische Chemie, Mess- und Sensortechnik, Technische Universität Dresden, 01062 Dresden, ²Kurt-Schwabe-Institut für Mess- und Sensortechnik e.V. Meinsberg, Kurt-Schwabe-Straße 4, 04720 Ziegra-Knobelsdorf

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird auf Grundlage experimenteller Ergebnisse an einem computergenerierten Modellsystem gezeigt, wie DNA-Sequenzen die Detektion von Hybridisierungen auf einem DNA-Mikroarray beeinflussen. Die Ergebnisse zeigen, dass neben Kreuzhybridisierungen auch Sekundärstrukturen (z. B. Haarnadelstrukturen) vermieden werden. Anderenfalls verringert sich die Empfindlichkeit und Nachweisgrenze des Sensors. Die vorgestellten Untersuchungen beruhen auf dem Messprinzip der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR). Es ist eine markierungsfreie Methode. Die Sensorschicht besteht aus einem 50 nm dicken Goldfilm, auf dem einzelsträngige und thiolmodifizierte Sonden-DNA immobilisiert ist. Die Adresssequenzen dieser Sonden werden als Anti-TAGs bezeichnet. Detektiert wird die Hybridisierung von einem Produkt der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Das PCR-Produkt besteht aus einer 300 Basenpaar-langen Doppelhelix mit einem 25 Basen-langen einzelsträngigen Überhang (TAG), der komplementär zu einer Anti-TAG-Sequenz ist (TAG/Anti-TAG-System).

1 Motivation

Eine schnelle, empfindliche und spezifische Detektion von DNA-Hybridisierungen ist von entscheidender Bedeutung für die medizinische bzw. genetische Diagnostik. Insbesondere werden dafür DNA-Chips mit immobilisierten DNA-Sonden eingesetzt. Die Sequenzen dieser Sonden müssen komplementär zu spezifischen DNA-Zielsequenzen sein. Bei der Auswahl dieser Sequenzen müssen verschiedene Aspekte berücksichtigt werden, um qualitativ hochwertige Mikroarrays mit zufriedenstellenden, vergleichbaren und dadurch validierbaren Signalen aller Spots zu erhalten. Dazu müssen ähnliche Schmelztemperaturen der Sonden gewährleistet sein. Kreuzhybridisierungen und Sekundärstrukturen (z. B. Haarnadelstrukturen) sollten vermieden werden.

Werden biologisch relevanten Sequenzen für die Sonden gewählt, ist die Auswahl dieser beschränkt. Kann man aber die spezifische Hybridisierung mit entsprechenden genetisch interessanten Bereichen auf die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beschränken und damit von der Detektion auf dem Mikroarray entkoppeln, ist die Entwicklung eines universellen Ansatzes für den Sensor möglich. Dabei ist eine eindeutige Adressierung der PCR-Produkte zu entsprechenden Sonden von entscheidender Bedeutung. [1, 2] Ansätze mit mehreren unterschiedlichen Primerpaaren (Multiplex-PCR) können beispielsweise so analysiert werden. Während die PCR-Produkte einzelsträngige Überhänge mit so genannten TAG-Sequenzen tragen, sind auf der Sensoroberfläche Sonden mit Anti-TAG-Sequenzen immobilisiert. Die Sequenzen des TAG/Anti-TAG-Systems sind unter diesen Umständen bei der Berücksichtigung von Kreuzhybridisierungen, Haarnadelstrukturen und des zu untersuchenden genetischen Systems frei wählbar.

In dieser Arbeit wurden bei der computergestützten Generierung der Modell-TAGs die Möglichkeiten zu Kreuzhybridisierungen vermieden, bei denen 7 Basen-lange Teilsequenzen der TAGs untereinander identisch oder komplementär sind. Das heißt, jede 7 Basen-lange Teilsequenz tritt unter allen 7 Basen-langen Teilsequenzen der TAGs nur einmal auf, wobei auch ihre komplementäre Sequenz nicht vorkommt. Die Modell-TAGs wurden mit und ohne Sequenzen generiert, die zur Bildung von Haarnadelstrukturen führen können.

Haarnadelstrukturen bei DNA-Einzelsträngen bestehen aus einer Stamm- und einer Schleifenstruktur. Die Stammstruktur bildet den doppelsträngigen Bereich mit komplementären Sequenzen während die Schleifenstruktur bei der Faltung einzelsträngig bleibt (**Bild 1**).

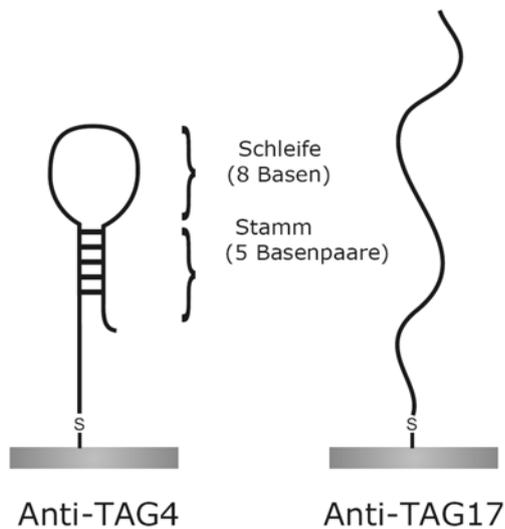


Bild 1 Anti-TAG-Sekundärstrukturen. Sequenzen in **Tafel 1**. *Links*: Schematische Darstellung einer Haarnadelstruktur mit einzelsträngiger Schleife und doppelsträngigem Stamm von Anti-TAG4. *Rechts*: Keine Faltung bei Anti-TAG17.

Studien über Haarnadelstrukturen zeigen, dass geringere Hybridisierungsgeschwindigkeiten und niedrigere Signale auf Sondenorten mit Haarnadelstrukturen zu erwarten sind. [3, 4] Daher wurden Sequenzen generiert, die teilweise Sekundärstrukturen ausbilden können, um ihren Einfluss auf die Signalstärken bei der Detektion zu untersuchen.

Die Experimente wurden basierend auf Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) durchgeführt, was eine markierungsfreie Detektion der Hybridisierung erlaubt. [5] Der Aufbau der Sensorschicht erfolgte durch die Immobilisierung einzelsträngiger und thiolmodifizierter Sonden-DNA mit Anti-TAG-Sequenzen auf einem 50 nm dicken Goldfilm. Die Ziel-DNA, Produkt einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR), besteht aus einer 300 Basenpaar-langen Doppelhelix mit einem 25 Basen-langen, einzelsträngigen Überhang mit einer TAG-Sequenz, die komplementär zum definierten Anti-TAG des Mikroarrays ist.

2 Material und Methoden

SPR-Plattform:

Es wurden spritzgegossene Topas[®]-Chips (76 mm x 26 mm x 4 mm) mit integrierter Optik und einer 50 nm dicken Goldschicht (3mm x 12 mm) verwendet. Das SPR-Spektrometer (Fraunhofer IOF, Jena) beleuchtet drei unterschiedliche, 1 mm x 10 mm große Bereiche der Goldoberfläche. Das reflektierte Licht fällt auf den Chip einer CCD Kamera. In einer Dimension werden die Signale örtlich auf 1280 Pixeln aufgelöst. Mit der zweiten Dimension der CCD Kamera (960 Pixel) wird eine winkelaufgelösten Analyse der an der Goldoberfläche reflektierten Intensität ermöglicht. Die Lage der SPR-Minima wird separat für alle 1280 Winkelspektren aufgezeichnet. Die Verschiebungen der Minima werden als SPR-Signale in der Einheit Pixel angegeben.

Mikrofluidik:

Auf dem Chip wird eine Anschlussplatte aus Aluminium mit Wärmetauscher und einer PDMS-Flusszelle aufgesetzt. Der Mikrokanal der Flusszelle ist ~ 120 µm hoch und 3 mm breit. Die Flüssigkeiten werden mittels einer 500 µl Spritzenpumpe durch die Flusszelle gedrückt bzw. gezogen.

Synthese der PCR-Produkte:

PCR-Produkte wurden durch die Verwendung von geeigneten Primer-Paaren synthetisiert. Als Templat diente der pUC19 Vektor. Die PCR-Produkte unterscheiden sich nur in ihrer einzelsträngigen TAG-Sequenz.

Immobilisierung Thiol-modifizierter Sonden-DNA:

Als Sonden-DNA wurde 3'-modifizierte Thiol-modifizierte, einzelsträngige DNA verwendet (**Tafel 1**). Mittels des Mikropipettiersystems NanoPlotter 2.1 (GeSiM mbH, Germany) wurden 50 μ l Volumina aufgetragen. Es wurden Spotting-Lösungen mit 10 μ M HS-ssDNA verwendet. Diese Lösungen wurden linienförmig, parallel im Abstand von 140 μ m aufgetragen. Innerhalb der Linien wurden die Tropfen im Abstand von 36 μ m abgesetzt. Danach wurden die Chips 30 min mit 1 mM Mercaptohexanol behandelt. [6]

Hybridisierung:

Es wurden 90 μ l entsprechender PCR-Produkte (5 ng/ μ l, in 120 mM MgCl₂) auf die Sensoroberfläche gebracht und 10 min lang über das DNA-Mikroarray im Mikrokanal vor und zurück gepumpt (6 μ l/s, 40 °C). Nach den Hybridisierungen mit unterschiedlichen PCR-Produkten wurde mit 120 mM MgCl₂ gespült und mit jeweils 100 mM Dinatriumethyldiamintetraacetat (Na₂H₂EDTA) und NaOH dehybridisiert. [7, 8]

3 Ergebnisse und Diskussion

Es wurden Experimente zur Detektion von Hybridisierungen auf einem SPR-Mikroarray durchgeführt. Verschiedene TAG/Anti-TAG-Paare ergaben unterschiedliche Signalthöhen (**Bild 2**). Anti-TAG4, -TAG5, -TAG12, und -TAG15 enthalten selbstkomplementäre Bereiche, welche Haarnadelstrukturen mit einer Stammlänge von 4 Basenpaaren ausbilden können und so zu auffällig niedrigen Signalen führen. Im Fall von TAG12/Anti-TAG12 ist zusätzlich die Bildung von Dimeren denkbar (**Tafel 1**). Bei der Bildung von Dimeren hybridisieren zwei DNA-Stränge mit gleicher Gesamtsequenz miteinander, weil selbstkomplementäre Sequenzbereiche auftreten.

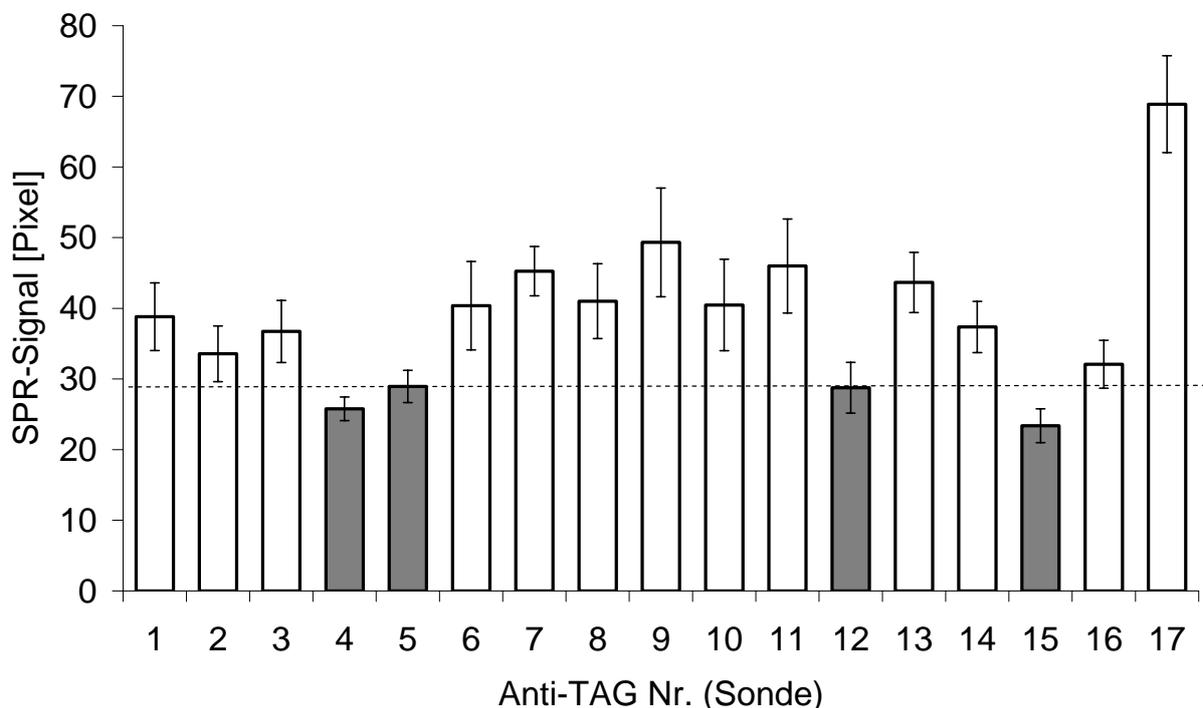


Bild 2 SPR-Signale nach 10 min Hybridisierung mit 5 ng/ μ l PCR-Produkten auf einem Mikroarray. Mittelwerte und Standardabweichungen der Werte von je 9 Spots eines Chips. Grau hervorgehoben sind auffällig niedrige Signale. Referenziert gegen Spots mit nichtkomplementärer Kontrollsonde.

Tafel 1 Sonden-Sequenzen. Selbstkomplementäre Bereiche sind fett und unterstrichen.

Name	Sequenz (5'-3'-(CH ₂) ₃ -SH)
Referenz ¹⁾	ACCGTGA AATGGTTGCAGTCCAACCATT TTTTTTT
Anti-TAG1	TCCTACCGAAGCAAGTGCACGCAATTTTTTTTTT
Anti-TAG2	TCGAATTGGCGGCATCTCATACCGATTTTTTTTTT
Anti-TAG3	TGTTGTTGCTAACCGACGTCCGTTCTTTTTTTTTT
Anti-TAG4	GT TACGT CCTCCAAC ACGTA CGCATTTTTTTTTT
Anti-TAG5	ACACC GCACAT TCAGTCATAG TGCAT TTTTTTTTT
Anti-TAG6	ATTATCCAGATACGGTCGAAGCGGCTTTTTTTTTT
Anti-TAG7	ACAGTCGACATGGCTCAACCGAATTTTTTTTTT
Anti-TAG8	GCCGACTGATGTGTTTCGATTGTGTTTTTTTTTTT
Anti-TAG9	CCTAGTCTACCGCATTCCTCGTCAATTTTTTTTTT
Anti-TAG10	CATCGTAAGCTCTGTATTCGCACGGTTTTTTTTTT
Anti-TAG11	GTCGCAGATCCGATTATAGAACGCGTTTTTTTTTT
Anti-TAG12	GCT TACGGCGTA TGTTGAGTACCATTTTTTTTTTT
Anti-TAG13	CTTGATCGATGTACGGCTAGACACCTTTTTTTTTTT
Anti-TAG14	CATGCTCGCGTTGTTAACTACTTGGTTTTTTTTTT
Anti-TAG15	AGGTAGATCCTACT CTCGTGATGCTTTTTTTTTTT
Anti-TAG16	CCAATTATCGCTAGAGTGTGTTGCCTTTTTTTTTTT
Anti-TAG17	ATAGGCTCTCCAGAATAAGGTCTCGTTTTTTTTTTT

¹⁾Sequenz ist nicht komplementär zu TAG-Sequenzen

Es kann geschlussfolgert werden, dass Haarnadelstrukturen und Dimere die Nachweisgrenze verringern und berücksichtigt werden müssen, wenn die Vergleichbarkeit der Signale für eine Quantifizierung der Hybridisierungen auf verschiedenen Spots eines Mikroarrays von Interesse ist. [9] Eine Stammlänge von mehr als 4 Basenpaaren ist zu vermeiden.

Außerdem kann mit der SPR-Plattform untersucht werden, ab welcher Länge komplementärer Bereiche messbare Kreuzhybridisierungen auftreten, was eine experimentelle Grundlage für die Optimierung des TAG/Anti-TAG-Systems darstellt. [8]

4 Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die Sächsische AufbauBank (FKZ: 14120/2447) unterstützt. Die Entwicklung der SPR-Plattform wurde durch das BMBF (03WKBH2F) gefördert. Die PCR-Produkte wurden durch die Biotype Diagnostic GmbH bereitgestellt.

Literatur

- [1] J. N. Hirschhorn, P. Sklar, K. Lindblad-Toh, Y. M. Lim, M. Ruiz-Gutierrez, S. Bolk, B. Langhorst, S. Schaner, E. Winchester, E. S. Lander, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **97** (2000) 12164-12169.
- [2] D. D. Shoemaker, D. A. Lashkari, D. Morris, M. Mittmann, R. W. Davis, Nat. Genet. **14** (1996) 450-456.
- [3] A. Tsourkas, M. A. Behlke, G. Bao, Nucleic Acids Res. **30** (2002) 4208-4215.
- [4] A. Tsourkas, M. A. Behlke, S. D. Rose, G. Bao, Nucleic Acids Res. **31** (2003) 1319-1330.
- [5] J. Homola, S. Yee, G. Gauglitz: Sensor. Actuat. B-Chem., **54** (1999) 3-15.
- [6] A. Kick, M. Bönsch, K. Kummer, D. V. Vyalikh, S. L. Molodtsov, M. Mertig: J. Electron Spectrosc., **172** (2009) 36-41.
- [7] M. Mertig, A. Kick, M. Bönsch, B. Katzschner, J. Voigt, F. Sonntag, N. Schilling, U. Klotzbach, N. Danz, S. Begemann, A. Herr, M. Jung: IEEE Sensors (2009) 392-395.
- [8] A. Kick, M. Bönsch, A. Herr, W. Brabetz, M. Jung, M. Mertig: IEEE Sensors (2010) 1636-1639.
- [9] A. Kick, M. Bönsch, B. Katzschner, J. Voigt, A. Herr, W. Brabetz, M. Jung, F. Sonntag, U. Klotzbach, N. Danz, S. Howitz, M. Mertig.: Biosens. Bioelectron. **26** (2010) 1543-1547.