

Entwicklung polymerbeschichteter DNA-Chip-Oberflächen für enzymatisch unterstützte Genotypisierungen

Caroline Hiller¹, Alfred Kick², Beate Katzschner², Mareen Müller¹, Martin Bönsch², Jan Voigt³, Dietmar Appelhans⁴, Werner Brabetz¹, Martin Jung¹, Michael Mertig^{2,3}

¹Biotype Diagnostic GmbH, Moritzburger Weg 67, 01109 Dresden

²Professur für Physikalische Chemie, Mess- und Sensortechnik, Technische Universität Dresden, 01062 Dresden

³Kurt-Schwabe-Institut für Mess- und Sensortechnik e.V. Meinsberg, Kurt-Schwabe-Straße 4, 04720 Ziegra-Knobelsdorf

⁴Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V., Hohe Str. 6, 01069 Dresden

Zusammenfassung

Wir stellen die Entwicklung von Polymerbeschichtungen auf Glasoberflächen vor, welche die Analyse geringer DNA-Mengen durch die Methode der ALR (*Arrayed Ligation Reaction*) ermöglicht. Dieses Verfahren wurde für den spezifischen Nachweis von Schimmel- und Hausfäulepilzen bei der Biotype Diagnostic GmbH etabliert.

1 Einleitung

Die DNA-Chiptechnologie bildet einen innovativen und effizienten Ansatz in der genetischen Diagnostik. Für diese Technologie stellen wir die Entwicklung von Polymerbeschichtungen auf Glasoberflächen vor, welche die Analyse geringer DNA-Mengen durch die Methode der ALR (*Arrayed Ligation Reaction*) ermöglicht. Dieses Verfahren wurde für den spezifischen Nachweis von Schimmel- und Hausfäulepilzen bei der Biotype Diagnostic GmbH etabliert (**Tafel 1**). Neben der Hybridisierung komplementärer DNA-Stränge findet dabei eine spezifische Enzymreaktion statt, bei der ein fluoreszenzmarkiertes DNA-Oligonukleotid kovalent an immobilisierte DNA-Sonden des Mikroarrays und damit an den DNA-Chip gebunden wird (**Bild 1**). Diese Ligationsreaktion findet jedoch nur statt, wenn die DNA-Zielsequenz zur Sonde und zum Ligationsoligonukleotid komplementär ist. [1-3]

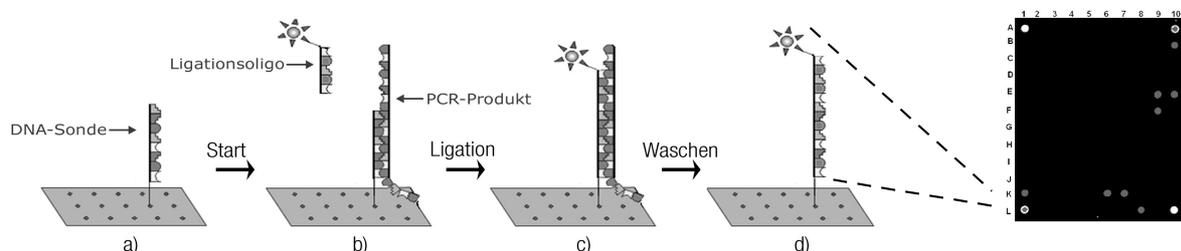


Bild 1 Darstellung der ALR auf einem Mikroarray. a) Produktfertige DNA-Chips; b) Hybridisierung des PCR-Produkts an die komplementäre DNA-Sonde; c) Ligation des fluoreszenzmarkierten Ligationoligonukleotids an die DNA-Sonde; d) Waschen der DNA-Chips.

Für diesen spezifischen Nachweis wird eine Beschichtung der Glasobjektträger entwickelt, die eine unspezifische Adsorption der Ligase und insbesondere der fluoreszenzmarkierten Ligationsoligonukleotide verhindert. Zugleich muss eine geeignete Oberfläche für die Enzymreaktion geschaffen werden, die eine genügend hohe Sondendichte aufweist und so einen spezifischen und sensitiven Nachweis erlaubt. Die gewünschte Hydrophobizität der Oberfläche ist so zu gestalten, dass die Enzymreaktion nicht beeinträchtigt wird.

Tafel 1 Mit dem MYCOTYPE® BASIDIO^{QS} MICROARRAY DETECTION KIT nachweisbare Hausfäulepilze.¹⁾

Wissenschaftlicher Name	Deutscher Name
<i>Antrodia sinuosa</i>	Schmalsporiger Weißer Porenschwamm
<i>Antrodia vaillantii</i>	Breitsporiger Weißer Porenschwamm
<i>Antrodia xantha</i>	Gelber Porenschwamm
<i>Bjerkandera adusta</i>	Angebrannter Rauchporling
<i>Coniophora arida</i>	Trockener Kellerschwamm
<i>Coniophora marmorata</i>	Marmorierter Kellerschwamm
<i>Coniophora olivacea</i>	Olivbrauner Kellerschwamm
<i>Coniophora puteana</i>	Brauner Kellerschwamm
<i>Daedalea quercina</i>	Eichenwirrling
<i>Donkioporia expansa</i>	Ausgebreiteter Hausporling
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Rotrandiger Baumschwamm
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	Tannenblättling
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	Zaunblättling
<i>Laetiporus spp.</i>	Schwefelporlinge
<i>Leucogyrophana mollusca</i>	Sklerotien Hausschwamm
<i>Leucogyrophana pinastri</i>	Gelbrandiger Hausschwamm
<i>Neo/Lentinus lepideus</i>	Schuppiger Sägeblättling
<i>Oligoporus placenta</i>	Rosafarbener Saftporling
<i>Phellinus ferruginosa</i>	Rostbrauner Feuerschwamm
<i>Pleurotus spp.</i>	Seitlinge
<i>Schizophyllum commune</i>	Gemeiner Spaltblättling
<i>Serpula himantoides</i>	Wilder Hausschwamm
<i>Serpula lacrymans</i>	Echter Hausschwamm
<i>Stereum hirsutum</i>	Zottiger Schichtpilz
<i>Stereum spp.</i>	Schichtpilze
<i>Tapinella panuoides</i>	Muschelkrempling
<i>Trametes versicolor</i>	Schmetterlingsporling

¹⁾Es wurden entsprechende, spezifische DNA-Sonden und Primer bzw. Template verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Beschichtung der Glasobjektträger

Objektglaträger aus Kalknatronglas (Menzel) wurden in Ethanol und in entionisiertem Wasser (je 5 min im Ultraschallbad) und 10 min in Luft-Plasma gereinigt. Anschließend wurde eine die Glasoberfläche mit 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GOPS) aus der Gasphase beschichtet.

Verzweigtes Polyethylenimin (PEI, CAS-Nummer: 9002-98-6) wurde an die GOPS-Oberfläche aus 0,1 %iger Lösung (0,1 M Natriumborat, pH = 9) gebunden. Die Aktivierung der Aminogruppen erfolgte anschließend aus wässriger Lösung mit 25 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC•HCl) und 25 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS).

2.2 Immobilisierung der DNA-Sonden

Amino-modifizierte DNA-Sonden (50 μM in 50 mM Natriumphosphat, 0,001 % Natriumdodecylsulfat) wurden mittels eines Mikropipettiersystems (Nano-Plotter, GeSiM mbH) auf den beschichteten Glasobjekt-trägern immobilisiert. Dabei wurden Tropfen mit einem Volumen von etwa 400 μl abgesetzt. Danach wurden die Chips in einer Feuchtekammer übernachtet inkubiert, mit entionisiertem Wasser gewaschen und mit 100 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 50 mM Ethanolamin (pH = 9) geblockt.

2.3 ALR

Es wurde das MYCOTYPE[®] BASIDIO^{QS} MICROARRAY DETECTION KIT verwendet und die ALR entsprechend dem vom Hersteller beschriebenen Protokoll durchgeführt. Als Template für die ALR-Experimente wurden zum einen äquimolare Gemische der PCR-Amplifikate aller detektierbaren Pilze, sowie Gemische synthetisch hergestellter Template eingesetzt (Tafel 1).

3 Ergebnisse und Diskussion

Verschiedene Ansätze zur Immobilisierung aminomodifizierter Oligonukleotide (NH_2 -DNA) wurden untersucht. Einerseits erfolgte eine Beschichtung durch Silanisierung der Glasobjektträger mit GOPS (**Bild 2 links**), andererseits wurde zusätzlich eine Polymerbeschichtung und Aktivierung in Form von N-Hydroxy-succinimidestern (NHS-Ester, **Bild 2 rechts**) vorgenommen.

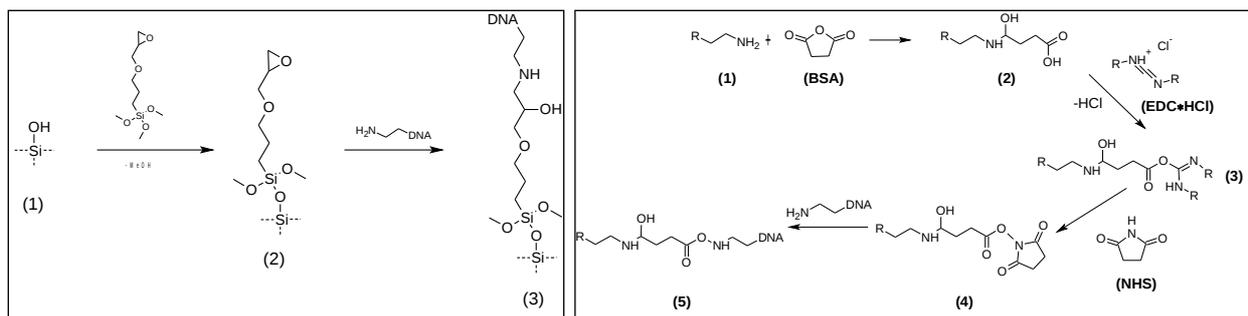


Bild 2 Links: Anbindung aminomodifizierter Oligonukleotide an eine GOPS-Oberfläche. GOPS wird an freie SiOH -Gruppen (1) gebunden. Aminomodifizierte Oligonukleotide binden an Epoxidgruppen (2). Rechts: Aminogruppen (1) der Oberfläche werden mit Bernsteinsäureanhydrid (BSA) zu Carboxylgruppen (2) umgesetzt, mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC·HCl) aktiviert und mit NHS verestert (4). Aminomodifizierte Oligonukleotide binden an NHS-Ester (5).

Die Fluoreszenzsignale nach der ALR sind für diese zwei Beschichtungen in **Bild 3** dargestellt. Die Spotgrößen der beiden Mikroarrays unterscheiden sich deutlich. Die Silanisierung (**Bild 3, links**) erzeugt eine Oberfläche, die schlechter benetzt als es durch die Beschichtung mit PEI der Fall ist (**Bild 3, rechts**).

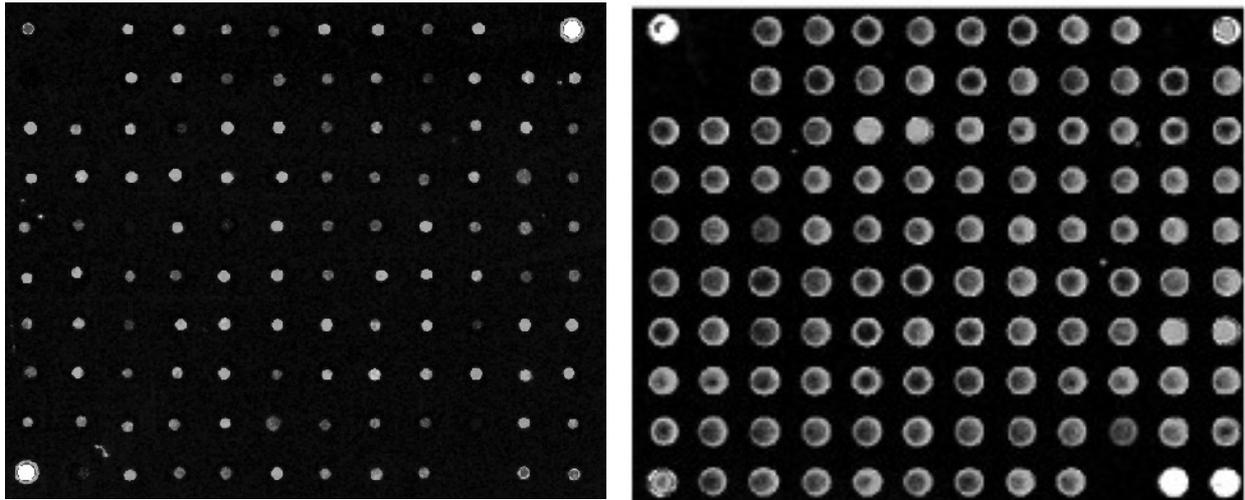


Bild 3 Fluoreszenzbild nach der ALR auf einem mit GOPS (links) und auf einem mit GOPS/PEI/NHS (rechts) beschichteten Chip.

Für die ALR erwies sich die PEI-Beschichtung als am besten geeignet. Durch diese konnte eine Verbesserung der Immobilisierung der Sonden, der Benetzung der Oberfläche, der Enzymreaktion und somit höhere Signalstärken erreicht werden.

4 Danksagung

Die diesem Artikel zugrunde liegenden Forschungsarbeiten werden durch die Sächsische AufbauBank (FKZ: 14119/2447 und 14120/2447) gefördert.

Literatur

- [1] E. Busti, R. Bordoni, B. Castiglioni, P. Monciardini, M. Sosio, S. Donadio, C. Consolandi, L. Rossi Bernardi, C. Battaglia, G. De Bellis: *BMC Microbiol.* **20** (2002) 2:27.
- [2] S. Case-Green, C. Pritchard, E. Southern: *Methods Mol. Biol.* **226** (2003) 255-269.
- [3] Kurg A, Tönisson N, Georgiou I, Shumaker J, Tollett J, Metspalu A: *Genet. Test.* **4** (2000) 1-7.