

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

DNA-optischer Sensor Chip zur Detektion von Hybridisierungsereignissen in Realzeit

Dr. Torsten Borchers (mit C. Peter, A. Katerkamp, M. Meusel, K. Cammann)

Institut für Chemo- und Biosensorik, Mendelstr. 7, D-48149 Münster

Tel. 0251-9802880

t.boerchers@icb-online.de www.icb-online.de

Registriernummer der Online-Anmeldung: 189

Vortrag

Nukleinsäuretests werden in vielen Bereichen der medizinischen Diagnostik bereits routinemäßig eingesetzt und finden zur Zeit auch Eingang in die Lebensmittelanalytik. Der Nachweis der wenigen, in einer Probe vorliegenden DNA-Moleküle bedingt in den meisten Fällen einen Amplifikationsschritt, typischerweise durch die Polymerasekettenreaktion (PCR). Aufgrund der Anfälligkeit der PCR für falsch positive Resultate (z.B. durch falsch hybridisierende Primer) wird häufig gefordert, dass die Identität der PCR Produkte bestätigt werden muss, so in den amtlichen §35-Methoden nach dem Lebensmittelbedarfsgegenstände-gesetz [1]. Hier können die Sequenzierung der amplifizierten DNA, eine hochauflösende Gelelektrophorese nach Restriktionsspaltung oder in der Regel die Hybridisierung mit einer spezifischen DNA Sonde zum Einsatz kommen. In dem klassischen Southern Blot-Verfahren wird dazu zunächst gelelektrophoretisch die DNA aufgetrennt, auf eine Membran übertragen, denaturiert und mit der markierten DNA Sonde hybridisiert. Die spezifisch gebundene, markierte DNA-Sonde wird dann in einer immunologischen Färbereaktion detektiert. In der vorliegenden Präsentation wird ein Biosensor vorgestellt, der dieses zeit- und arbeitsaufwendige Verfahren drastisch beschleunigt und vereinfacht.

Dieser DNA-Biosensor basiert auf einem fluoreszenzoptischen Sensorsystem, das ursprünglich für die Immunanalytik entwickelt wurde [2-4], mit dem aber als spezielle Rezeptor-Ligand Wechselwirkung auch DNA-Hybridisierungen in Realzeit verfolgt werden können. Das Sensorsystem besteht aus einem Einweg-Sensorchip und einem Bench-Top Gerät mit einer Laserdiode für die Anregung des Fluorophors (Cy5), einem Photomultiplier für die Detektion der Fluoreszenz und einer Pumpe für die Durchführung von Durchflußmessungen. Ein Kunststoffoberteil aus Polymethylacrylsäuremethylester (PMMA) sowie eine Grundplatte mit integriertem Prisma (ebenfalls PMMA) und einem 200 µl Probencontainer bilden den Sensorchip. Beide sind durch einen Transferklebefilm miteinander verbunden, durch dessen Innenausstanzung ein 50 µm hoher Fließkanal gebildet wird. Der Ausgang des Fließkanals ist über ein Septum und eine Nadel an die Fluidik des Auswertegerätes angeschlossen. Während der Messung binden Cy5-markierte DNA-Target Moleküle an Fangsonden,

die über die (Neutr)avidin-Biotin Wechselwirkung auf der Oberfläche des Fließkanals immobilisiert worden sind. Die Anregung der Cy5-Fluorophore erfolgt im evaneszenten Feld, das durch Totalreflexion eines Laserstrahls an der Grenzfläche zwischen dem optisch dichteren Kunststoffprisma des Chips und der optisch dünneren Probenflüssigkeit entsteht. Die Intensität des evaneszenten Feldes ist direkt über dem Fließkanal maximal und nimmt mit zunehmender Eindringtiefe in die Probenflüssigkeit exponentiell ab, so dass nur die gebundenen Fluorophore (also in unmittelbarer Nähe zur Sensoroberfläche) angeregt werden. Die Hybridisierung eines Cy5-markierten DNA-Targets an eine immobilisierte Sonde kann also ohne weitere Waschschrte und in Realzeit verfolgt werden. In dem Vortrag wird der hier vorgestellte DNA-optische Biosensor auf der einen Seite von den hochgradig parallelisierten DNA-Chips [5] abgegrenzt, auf der anderen Seite mit solchen DNA-Biosensoren verglichen, die andere Transducer-Prinzipien verwenden (direkt-optisch über Oberflächenplasmonresonanz, piezoelektrisch oder elektrochemisch) [6].

Die Durchflussbedingungen wurden so gewählt, dass der Stofftransport kaum durch Diffusion limitiert ist und maßgeblich durch Konvektion erfolgt. Aufgrund der im Durchfluss konstanten Konzentration an DNA-Target und einem großen Überschuss an Fangsonde vereinfacht sich die Bindungskinetik und für kurze Zeiträume steigt das Fluoreszenzsignal linear mit der Zeit an:

$$R(t) = R_{\max} * k_{\text{on}} * C_{\text{Target}} * t + R_0$$

Die Steigung bei dieser kinetischen Auswertung ist direkt proportional zu Konzentration an DNA-Target. Die Gültigkeit dieses Zusammenhanges wird für mehrere Oligonukleotidsysteme gezeigt und auch der Einfluss von äußeren Bedingungen wie Hybridisierungspuffer, Temperatur sowie von Basenaustauschen auf die Steigung beschrieben. Die Nachweisgrenze für ein einzelsträngiges 56mer DNA-Target betrug 0.5 nM. In Abhängigkeit von der Länge der Fangsonde konnte ein single-mismatch bei der Hybridisierung detektiert werden, so dass sich der Sensor für die SNP-Analytik eignet.

Mittels einer beweglichen Lochblende können Einlass- und Auslass-Seite unabhängig voneinander detektiert werden. Durch die Dispensierung unterschiedlicher Fangsonden auf beiden Seiten des Fließkanals konnten 2 Targets mit entsprechend unterschiedlicher Sequenz simultan und ohne Beeinträchtigung von Nachweisgrenze und Spezifität nachgewiesen werden. Nach dieser eingehenden Charakterisierung des Sensorsystems wurde die Tauglichkeit für reale Problemstellungen demonstriert und ein Cy5-markiertes, doppelsträngiges PCR Produkt spezifisch und mit einer Nachweisgrenze ebenfalls im Bereich von 1 nM nachgewiesen, also deutlich besser als mit konventioneller Gelelektrophorese. Somit eignet sich der DNA-optische Sensor Chip insbesondere für solche Anwendungen, in denen außer einem bestimmten PCR Produkt (z.B. für den Nachweis von gentechnisch veränderten Lebensmitteln) auch interne Standards bzw. Amplifikationskontrollen oder Mutationen detektiert werden sollen.

Literatur

- [1] L 23.01.22-1 (1998) Detection of a genetic modification of soybeans by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsmethoden nach §35 LMBG, BgVV, Loseblattausgabe. Beuth, Berlin

- [2] Katerkamp, A. (1997) *Patent* DE1962008
- [3] Meusel, M., Trau, D., Katerkamp, A., Meier, F., Polzius, R. and Cammann, K. (1998) *Sens. Actuators* **51**, 249
- [4] Schult, K., Katerkamp, A., Trau, D., Grawe, F., Cammann, K. and Meusel, M., (1999) *Anal. Chem.* **71**, 5430
- [5] Niemeyer, C. and Blohm, D. (1999) *Angew. Chem.*, **111**, 19
- [6] Junhui, Z., Hong, C. and Ruifu, Y. (1997) *Biotechnol. Advances*, **15**, 43