

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

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

Entwicklung von Oligonukleotidarrays für den Mikrobennachweis

Claudia Preininger¹, Irmgard Gsoels², Wolfgang Kern² and P. Chiarelli³

¹Österreichisches Forschungszentrum Seibersdorf, Bereich Lebenswissenschaften, Geschäftsfeld Biotechnologie, A-2444 Seibersdorf,

Tel. +43 50550 3527, Fax +43 50550 3653, email: claudia.preininger@arcs.ac.at

²Technische Universität Graz, Institut für Chemische Technologie organischer Stoffe, Stremayrgasse 16/1, A-8010 Graz

³“Centro E. Piaggio“, Universität Pisa, Institut für Ingenieurswesen, Via Diotalvi 2, I-56100 Pisa

Registriernummer der Online-Anmeldung: 187

Poster

Anordnungen von biomolekularen Sonden auf Festkörperoberflächen (Arrays, Chips) sind das Herzstück von Konzepten zum Aufbau von parallel arbeitenden miniaturisierten Analysesystemen, die die heute üblichen Verfahren beim chemisch-biologischen Screening und der molekularen Diagnostik ersetzen werden.

Die Arrays werden nach der Art der immobilisierten Sonden bzw. nach Art der Herstellung der Sonden unterteilt. Die DNA-Sonden werden entweder *in situ* mittels photolithographischer Methoden unter Verwendung physikalischer Masken auf der Matrix synthetisiert oder durch verschiedene Verfahren aufgedruckt. Die Herstellung von gedruckten DNA Mikroarrays gliedert sich in die Schritte der Aktivierung bzw. Beschichtung der festen Chipmatrix, an die Biomoleküle über eine geeignete Kopplungschemie fixiert werden.

Zur Herstellung von Oligonukleotidarrays für den Mikrobennachweis wurden Glasobjektträger mit Polymermaterialien beschichtet und mit unmodifizierten oder amino-modifizierten 18-50mer Oligonukleotiden bedruckt. Die Oligonukleotide wurden mit dem piezoelektrischen BioChip Arrayer von Packard in Volumina von 0,35-2 nl auf dem Chip aufgebracht. Die Spotmorphologie wurde in Abhängigkeit vom Spotvolumen, dem Druckpuffer und der Polymereigenschaften untersucht.

Prinzipiell wurden zwei Methoden zur Oberflächenaktivierung verwendet:

➤ Glasobjektträger (25 x 75 mm) wurden mit Poly(vinylalkohol) / Poly(allylaminchlorid) / β -Cyclodextrin (PVA/Palam/CD) Hydrogel beschichtet und durch 6 Gefrierzyklen gehärtet. Es wurden PVA/Palam/CD Cocktails mit unterschiedlichem Molverhältnis und pH-Wert (pH4 bis pH8) hergestellt. Die Oberflächen wurden hinsichtlich ihrer mechanischen Stabilität, Lagerstabilität, Immobilisierungskapazität von 18mer Oligonukleotiden über 14 h, Porosität, Vernetzungsgrad und Quellverhalten untersucht und charakterisiert.

➤ Glasobjektträger wurden mit inerten Polymeren wie Teflon, Low-Density (LD)-Polyethylen und Kautschuk beschichtet. Die Besonderheit der Trägermaterialien besteht darin, dass durch photochemische Prozesse die Oberfläche des Basispolymers soweit verändert wird, dass in den bestrahlten Bereichen eine Immobilisierung der DNA-Moleküle erfolgt. Die photochemische Oberflächenmodifizierung beruht darauf, dass die Bestrahlung der Polymeroberfläche in Gegenwart eines UV-reaktiven Gases erfolgt, sodass über radikalische Reaktionen funktionelle Gruppen an das Polymer gebunden werden. Hierdurch können basische Gruppen (-NH₂), saure Gruppen (-SO₃H) oder neutrale Funktionen (-CN) eingeführt werden. Die funktionellen Gruppen werden durch nachträgliche Reaktion so derivatisiert, dass eine ausreichende und spezifische Reaktivität gegenüber den DNA-Sequenzen gegeben ist.

Teflon und Negativ-Photoresist (ein mit Bisazid vernetzter Kautschuk) wurden in Anwesenheit von wasserfreiem Hydrazin mit UV-Strahlung behandelt. Die eingeführten Aminogruppen wurden mit 10%iger p-Phenylendiisothiocyanatlösung umgesetzt. LD-Polyethylen wurde in Anwesenheit von SO₂/Luft unter UV-Strahlung modifiziert. Nach Einführung der Sulfonsäuregruppen auf der Oberfläche wurden diese mit PCI₅ in Sulfonsäurechloridgruppen und mit 1, 6 Diaminohexan weiter in Sulfonsäureamidgruppen überführt. Als Analysenverfahren wurden ATR-FTIR-Spektroskopie und XPS eingesetzt.

Auf die aktivierten Chipoberflächen wurden spezifische 16S rRNA Oligonukleotid sonden aufgebracht und mit Cy5-markiertem Rhizobium Fredii hybridisiert. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mit dem Fluoreszenzscanner Genepix 4000TM.

Die ARCS-Chips wurden mit den kommerziellen GAPSTM-Chips von Corning, den CASTTM- und FASTTM-Slides von Schleicher & Schuell, den ArrayLink hydrophob-Slides von Genescan Europe, den Aldehyd-Slides von Cel Assoc. (Telechem), den Aminoalkylsilan-Slides von Sigma und den Epoxy-Slides von Surmodics auf ihre Anwendbarkeit als Oligonukleotidarrays (<50 Basen) untersucht (siehe Fig. 1).

Slidetyp (Polymer)	Herstellung	% Immobilisierungskapazität*
Aminoalkylsilan	Sigma	≤10
Nylon	Amersham	≤10
Aminoalkylsilan	Corning	≤10
Nitrocellulose	Schleicher & Schuell	≤5
Epoxy polymer	Surmodics	≥70
Poly(vinyl alkohol)	ARCS	≥90
Negative-Photoresist	ARCS	≤60

* nach 14 h bei 50 °C in 20 mM Trispuffer, pH 7.4, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS, 20% Formamid

Fig.1