

„Microarrays – Tendenzen in der Analytik“

Matthias Grießner, Michael Breitenstein*, Sebastian Hoppe*, Frank F. Bier, Eva Ehrentreich-Förster, Markus von Nickisch-Rosenegk*

*Die Autoren haben gleichberechtigt am Artikel mitgewirkt.

Einleitung

Die Technologie der Microarrays steht seit mehreren Jahren im Fokus der Bioanalytik. Besonders interessant hierbei sind die Möglichkeiten einer hohen Parallelisierung und der geringe Verbrauch an zumeist teuren Agenzien. Die Anwendungen reichen dabei von A wie Allergendetektion bis Z wie Zinkfinger-Promoter. Allen gemeinsam ist die orts aufgelöste Applikation von Molekülen auf ein chemisch/physikalisch modifiziertes Substrat, die durch verschiedene Vorgehensweisen realisiert werden kann. Neben den photolithographischen Methoden, die sehr hohe Featuredichten erlauben und eine direkte Synthese der Biomoleküle auf dem Substrat beinhalten, unterscheidet man weiterhin zwei physikalische Methoden der Auftragung. Zum einen das „contact printing“. Dabei werden Stahlnadeln in die zu applizierende Lösung getaucht und danach auf das Substrat gedrückt. Das Prinzip ist analog zu dem eines Tintenfassens mit Federkiel. Ein Nachteil dieser Methode ist eine mögliche Zerstörung der modifizierten Substratoberfläche durch die mechanische Einwirkung. Eine Methode, die dieser Limitierung nicht unterliegt, ist das „non-contact printing“. Die Features werden dabei durch Verdrängung oder durch einen Druckimpuls, der auf die Probenlösung wirkt, als Tropfen auf das jeweilige Substrat aufgetragen. Dies ist vergleichbar mit einem Puderzuckerstreuer.

Eine Sonderform der Auftragung ist die Molecular-Ink-Lithography. In diesem Fall wird die Probe kontaktfrei durch Diffusion auf das Substrat aufgebracht.

Eine Herausforderung bei der Umsetzung all dieser Verfahren ist die richtige Methode für den jeweiligen Zweck zu finden und eine reproduzierbare und qualitativ hochwertige Applikation zu gewährleisten. Hierfür ist es mitunter notwendig, chemische Modifikationen an den Strukturen, die zur Auftragung benötigt werden, vorzunehmen.

Nachfolgend sollen exemplarisch drei Beispiele für aktuelle, experimentelle Problemstellungen aus dem Bereich der Microarrays erläutert werden.

Problemstellungen

Das Problem der Qualität

Um Features zu setzen, ist es notwendig, spezielle Applikatoren (Spotter) zu verwenden. Ein Beispiel hierfür ist der sogenannte Topspot.

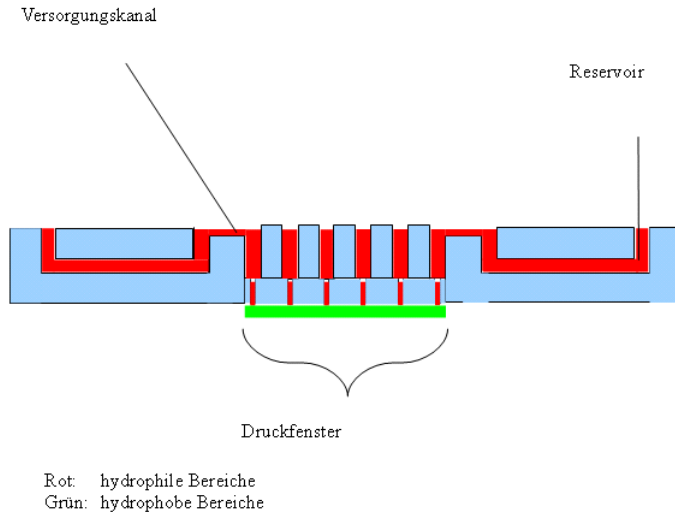


Abbildung 1a

Dieses System verwendet Druckköpfe (Abbildung 1a), die mit 24 Reservoiren bestückt sind. In jedes Reservoir kann eine Probe gefüllt werden, die dann separat mit Hilfe eines Druckimpulses kontaktfrei auf ein Substrat aufgetragen wird. Der Druckkopf unterliegt durch mechanische Belastungen während des Drucks und bei der Reinigung dem Problem der Materialermüdung. Dies führt dazu, dass Features nicht mehr richtig im Raster gesetzt werden, Satellitentröpfchen gebildet werden

oder eine Vermischung der Features stattfindet. Die so erzeugten Mikroarrays sind schwierig auszuwerten und führen im schlimmsten Fall zu falsch positiven Ergebnissen.

Ein Ziel ist deshalb die einfache, schnelle und kostengünstige Regenerierung der Druckköpfe zur Qualitätssteigerung des applizierten Mikroarrays. Niederdruckplasmaanlagen (Abbildung 1b) bieten hier eine interessante Möglichkeit, da mit ihnen sowohl hydrophile, mit Hilfe von Sauerstoffplasma, als auch hydrophobe Oberflächen, mit Hilfe von Plasmapolymerisation, erzeugt werden können, die zur Befüllung beziehungsweise für den Tropfenabriss notwendig sind (Abbildung 1a).

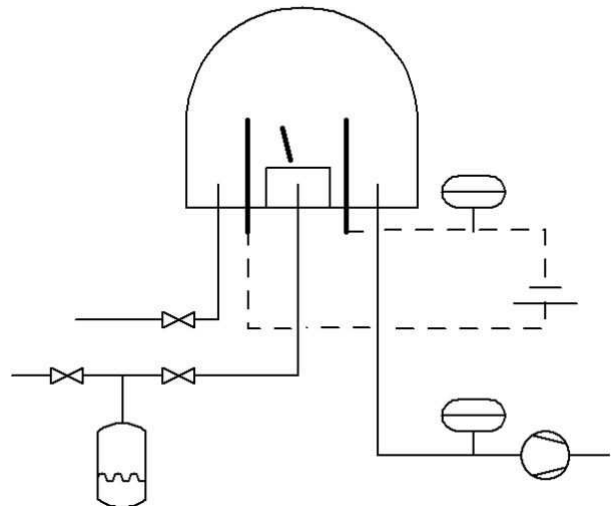


Abbildung 1b

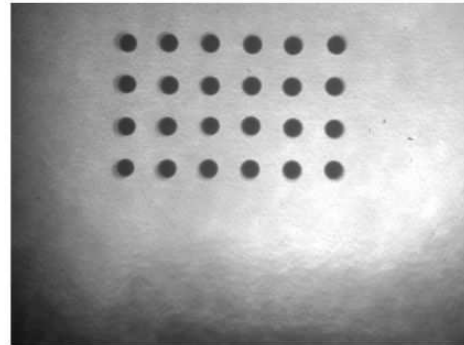
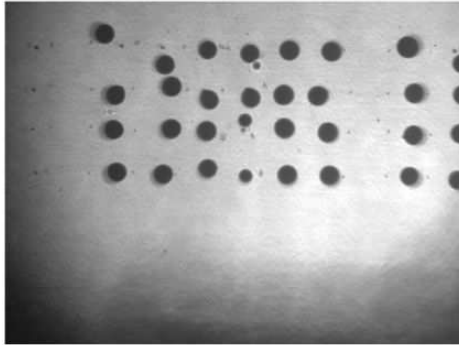


Abbildung 2a: vor der Behandlung des Druckkopfes Abbildung 2b: nach der Behandlung des Druckkopfes

In den Abbildungen 2a und 2b sind die Auftragungsergebnisse vor der Behandlung eines Druckkopfes mit Plasma und danach dargestellt. Deutlich ist die Verbesserung des Druckbildes ersichtlich. Die hierfür verwendete Methode ist innerhalb von 10 min durchführbar und nutzt kostengünstiges Hexamethyldisiloxan als Precursor für die Plasmapolymerisation in einer einfachen Vakuumapparatur (Abbildung 1b). Gegenüber dem Kauf eines neuen Druckkopfes ist somit eine Kostenersparnis von 99% möglich.

Das Problem der „kleinen Features“

Wo herkömmliche Applikatoren an ihre technischen Grenzen stoßen, beginnt die Molecular-Ink-Lithography. Das gezielte, punktgenaue Absetzen der nur Bruchteile eines Mikrometers messenden Spots erfolgt hier mit einem Rasterkraftmikroskop (engl. atomic force microscope, AFM). Die Rasterkraftmikroskopie hat insbesondere als bildgebendes Verfahren, gerade bei biologischen Proben, Bedeutung erlangt und konnte durch „Zweckentfremdung“ der Abtastspitze, welche bei der Molecular-Ink-Lithography die Funktion eines Füllfederhalters übernimmt, immens erweitert werden (Abbildung 3a)

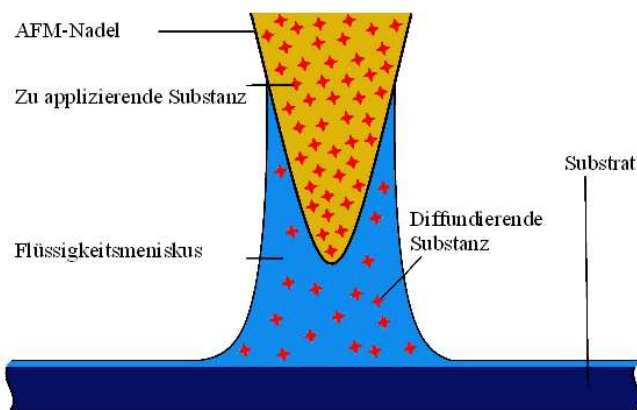


Abbildung 3a

Für die Nanofunktionalisierung wird die Abtastspitze mit der zu spottenden Substanz, der sog. „Tinte“, beladen und anschließend in rasterkraftmikroskopischer Auflösung diffusionsvermittelt gespottet. Bringt man die Abtastspitze in hinreichend geringen Abstand zur Zieloberfläche, bildet sich ein Wassermeniskus zwischen Spitze und Oberfläche aus. Diffusion von der substanzbeladenen Spitze hin zur

substanzarmen Oberfläche führt zu einem Feature, dessen Größe mittels der Kontaktzeit eingestellt werden kann.

In Abbildung 3b ist ein DNA-Mikroarray zu sehen, dessen Spottedurchmesser nur wenige hundert Nanometer groß sind (300 nm). Diese Größenordnungen rechtfertigen bereits die Bezeichnung „Nanoarray“. Die enorme Präzision hinsichtlich der Positioniergenauigkeit resultiert aus der naturgemäßen hohen Auflösung des Rasterkraftmikroskops.

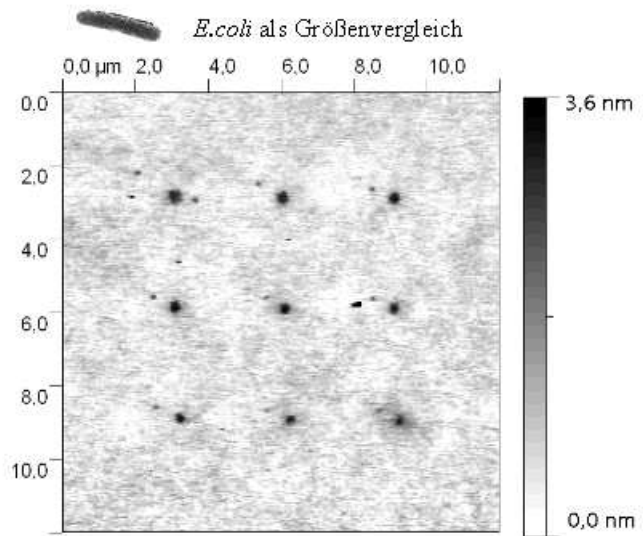


Abbildung 3b

Das Problem der Einzelbasen-Detektion

Die Einzelbasenmutation (engl. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) verursacht kleine Änderungen in der DNA von Individuen mit weit reichenden Folgen für den Phänotyp.

So lassen sich viele Phänomene wie die Neigung zur Glatzenbildung, die Augen-, Haut- oder Haarfarbe sowie Resistenzen und Anfälligkeiten gegen Krankheiten und bestimmte Krebsarten auf diese Art der Mutation zurückführen. Treten SNPs im mitochondrialen Genom auf, so sind sie häufig die Ursache von Erbkrankheiten, die schwerwiegende Konsequenzen für den Stoffwechsel haben und zu mannigfaltigen Symptomen führen. Eine frühzeitige Erkennung der Gendefekte kann helfen, die Symptome zu lindern.

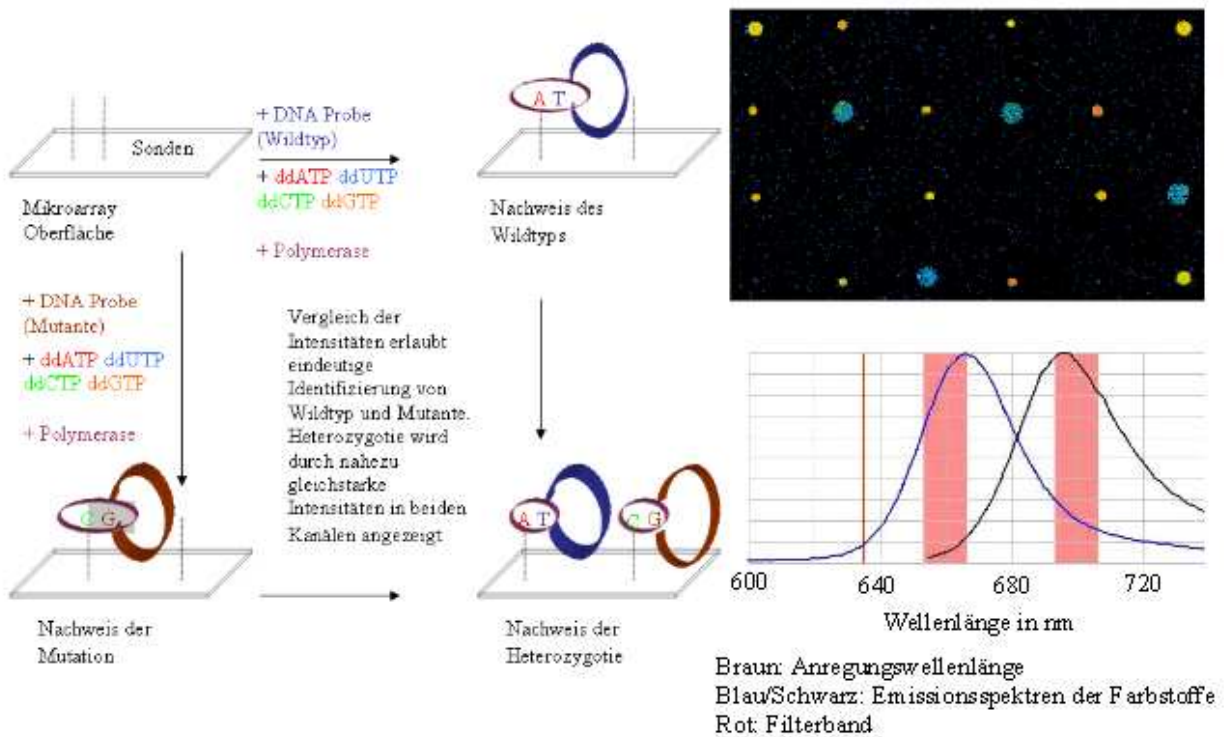


Abbildung 4

Der Nachweis der Einzelbasenmutationen findet im Microarray mittels kurzer, genspezifischer immobilisierter Sonden statt (Abbildung 4), die so konzipiert wurden, dass sie genau eine Base vor der Einzelbasenmutation enden. Nach Hybridisierung der einzelsträngigen Proben-DNA an die Sonden, werden die Sonden in einer enzymatischen Reaktion durch eine thermostabile Polymerase um eine Nukleotidbase verlängert und zwar so, dass die eingebaute Base komplementär zur Einzelbasenmutationsstelle ist. Normalerweise wird jede Base mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert und jeweils mit einem Laser unterschiedlicher Anregungswellenlänge untersucht. Durch die Optimierung der Farbstoffe (unterschiedlich starker Stokes Shift bei gleicher Anregungswellenlänge) war es möglich, sich auf die Verwendung von nur zwei Lasern und Emissionsfiltern zu beschränken. Das stellt eine deutlich einfachere und kostengünstigere Variante zum herkömmlichen Nachweis mit vier Lasern dar.