

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

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

Dendrimer-aktivierte Chipmatrix für die Herstellung von Nukleinsäure- und Protein-Microarrays

Benters, R.^{*}; Wöhrle, D.^{*}; Niemeyer, C.M.^{**}

* Institut für Organische und
Makromolekulare Chemie
Universität Bremen, FB2 – NW2
P.O. Box 330440
28334 Bremen
ruebe@chemie.uni-bremen.de

** Biotechnologie und molekulare
Genetik
Universität Bremen, FB2 – UFT
P.O. Box 330440
28334 Bremen

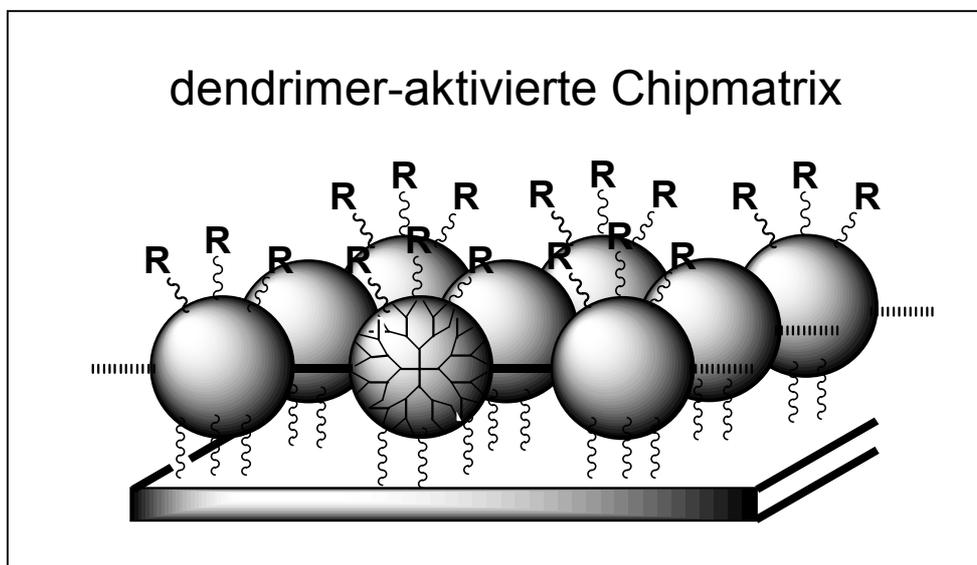
Registriernummer der Online-Anmeldung: 137

Poster

Für die Herstellung von Microarrays durch Immobilisierung bioorganischer Sondenmoleküle, wie DNA-Fragmente oder Proteine, mittels automatisierter Dispenser- oder Plottersysteme werden modifizierte Oberflächen benötigt, die eine physikalische oder chemische Bindung zum Biomolekül ausbilden können. ^[1-3] Als Trägermaterial für die Herstellung von Microarrays hat sich aufgrund seiner hohen mechanischen und chemischen Stabilität, sowie seiner geringen Eigenfluoreszenz Glas bewährt. Damit Biochip-basierte Analysen reproduzierbar und mit hoher Nachweisempfindlichkeit durchgeführt werden können, ist es unabdingbar, daß die Modifikation einerseits homogen über die gesamte Chipoberfläche verläuft und andererseits eine hohe Dichte aktiver Kopplungsstellen für das Sondenmolekül bereitstellt. Desweiteren ist es wünschenswert, daß einmal eingesetzte Microarrays durch Regeneration wiederverwendet werden können. Zur Zeit gängige Verfahren, wie z. B. das UV-induzierte Crosslinking an amino-funktionalisierte oder polyamidbeschichtete Trägersysteme, ^[4] sowie die Chemisorption thiolierter Verbindungen an Gold weisen diesbezüglich erhebliche Defizite auf. Verbesserte Eigenschaften lassen sich erzielen, wenn die Immobilisierung kovalent über ein Linkersystem zwischen Trägermaterial und Biomolekül erfolgt. Wir berichten hier über ein Modifikationsverfahren, das durch den Aufbau einer dendritischen Polymerschicht eine hocheffiziente, kovalente Immobilisierung von Sondenmolekülen erlaubt. ^[5]

Zunächst wird die chemisch nur begrenzt reaktive Glasoberfläche durch Silylierung mit einem amino-funktionalisiertem Silan aktiviert. Durch systematischen Vergleich Literatur-bekannter Silylierungsverfahren wurde die Wahl der Silylierungsparameter, wie Lösungsmittel und Reaktionszeit, optimiert. Auf der Basis der optimierten Silylierung wurden komplexe Linkersysteme aufgebaut, indem

zunächst lineare, homobifunktionelle Crosslinker an die Aminogruppen der Glasoberfläche gekuppelt wurden. In einem zweiten Schritt wurden terminal funktionalisierte, dendrimere Monomere an die aktivierten Oberflächen gebunden, die anschließend durch homobifunktionale Crosslinker vernetzt und gleichzeitig chemisch aktiviert wurden. Die entstehenden polyfunktionalisierten Dünnschichten wurden zur Kupplung von DNA Oligomeren und Proteinen verwendet. Hybridisierungsexperimente mit entsprechend hergestellten DNA Arrays zum Nachweis fluoreszenzmarkierter DNA Fragmente zeigten, daß die Dendrimer-Oberflächen für den hochempfindlichen Nachweis von Nucleinsäuren bestens geeignet sind. Darüber hinaus wurde eine sehr homogene Verteilung der Aktivschicht über den gesamten Glaträger nachgewiesen. Scharf abgegrenzte Spots, eine geringe unspezifische Bindung der Fluorophor-markierten Ziel-Nucleinsäuren sowie eine überraschend hohe physikalisch-chemische Stabilität wurden als weitere Vorteile der neuen Oberflächen festgestellt.



Schematische Darstellung der dendrimer aktivierten Chipmatrix.

Ein Glaträger wurde mit linearen Linkern chemisch so aktiviert, daß dendritische Monomer-Einheiten (hier als schattierte Kugeln dargestellt) angebunden werden können. Mittels geeigneter Crosslinker werden die monomeren Dendrimere anschließend zu einem Copolymerfilm vernetzt, an dem DNA-Oligomere oder Proteine über die funktionelle Gruppe R immobilisiert werden können.

Literatur

- [1] Wang, J., *Nucleic Acids Research* **28**(16) 3011-3016 (2000)
- [2] Beier, M.; Hoheisel, J.D., *Nucleic Acids Research* **27**(9) 1970-1977 (1999)
- [3] MacBeath, G.; Schreiber, S.L., *Science* **289**, 1760 (2000)
- [4] Cheung, V.G.; Morley, M.; Aguilar, F.; Massimi, A.; Kuchertapati, R.; Childs, G., *Nature Genetic Supplement* **21** 15-19 (1998)
- [5] Benters, R.; Niemeyer, C.M.; Wöhrle, D., Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht (2000).