

Vorteile des preiswerten, robusten ICB DNA-Chips

Ein grosser Vorteil des DNA-Biosensors des ICB im Vergleich zur konventionellen DANN-Chiptechnologie ist die einfache Regenerierbarkeit der einfach herzustellenden Chips durch einen alkalischen Waschschrift. So können z.B. problemlos 15 bis 20 Messungen auf einem integrierten Mikrofluidik Chip nacheinander durchgeführt werden. Die Reproduzierbarkeit liegt dann i.d.R. bei ca. 4 % bei 7 betrachteten Messungen und der Signalverlust durch Regeneration beträgt weniger als 1 % pro Messung. Auf diese Art können ganze Messreihen auf demselben Chip durchgeführt werden, was die Ergebnisse im hohen Maße vergleichbar macht und die Kalibration vereinfacht.

Die üblicherweise nur sehr kurzen Messzeiten und die Bewegung der Messlösungen auf den DNA-Biosensoren führen zu der allgemein sehr guten Arbeitsstabilität und hohen Robustheit. Bei konventionellen DNA-Chips, auf denen eine stehende Lösung über einen längeren Zeitraum hybridisiert wird und die hybridisierten Produkte erst nach dem Trocknen detektiert werden, ist eine vollständige Regenerierung nicht mehr möglich, da irreversible Wechselwirkungen auftreten. Für jede zu messende Probe muss demnach ein neuer Chip verwendet werden, wobei insbesondere die genauen Hybridisierungsbedingungen unter einem Deckgläschen (z.B. häufig Evaporieren der Probenflüssigkeit, Erschütterungen, etc.) nicht einstellbar sind. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wird dadurch deutlich schlechter. So wird von 30 – 50 % Abweichung zwischen den Mittelwerten verschiedener Arrays berichtet, abgesehen von Fehlinterpretationen durch Kreuzhybridisierungen. Bei der Hybridisierung stehender Lösungen unter einem Deckgläschen oder in einem Hybridisierungsrahmen kommt es zu inhomogenen Targetverteilungen auf dem Array. Dies führt auch innerhalb eines Arrays zu Abweichungen der Signale von 10 – 25 %. Vor dem Vergleich der Ergebnisse verschiedener Chips sollte daher stets eine Normalisierung erfolgen, um diese bekannten Unregelmäßigkeiten auszugleichen.

Nachdem das ICB DNA-Biosensorsystem mit den synthetischen Modelltargets charakterisiert wurde, konnte auch seine Eignung zur Messung von PCR-Produkten demonstriert werden. Die PCR-Produkte wurden in der Regel nach thermischer Denaturierung analysiert. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals mit der Zeit war bei den PCR-Produkten ebenfalls linear. Die Kalibrationsgeraden zeigten, dass weiterhin auch der lineare Zusammenhang zwischen Konzentration der Proben-DNA und Signalanstieg zu Beginn der Hybridisierung besteht. Wegen der Regenerierbarkeit können beispielsweise eine Serie von Probenmessungen durch zwei Kalibrierungsläufe eingerahmt werden, was die quantitative Auswertung sehr erleichtert.

Die genaue quantitative Analyse von PCR-Produkten in DNA-Biosensoren wird in der Literatur nur relativ wenig erwähnt (z.B. eine Hybridisierung von 143, 256 und 391 bp großen, doppelsträngigen PCR-Produkten mit einer 18-mer Sonde in einem BIAcore-Sensor). Auch mit elektrochemischen und piezoelektrischen Systemen wurde die Detektion von PCR-Produkten nur selten beschrieben. Verglichen mit einem BIAcore-Sensor zeigten elektrochemische und piezoelektrische Systeme schlechtere Reproduzierbarkeiten und einen uneinheitlichen Zusammenhang zwischen Sensorsignal und PCR-Produkt-Konzentration.

Vergleich von konventionellen DNA-Chips und DNA-Biosensor des ICB

Eigenschaften: Konventionelle DNA-Chips

Array *high-* und *low-density*

Reproduzierbarkeit: ca. 40 %

Spezifität: viele schwache Kreuzhybridisierungen

DNA-Biosensor des ICB

low-density

ca. 5 %

fast keine Kreuzhybridisierungen

Nachweisgrenze:	ca. 0.1 %	ca. 0.1 %
Benötigte Menge		
PCR-Produkt:	3.25 µl	4 µl
Durchsatz:	1 Messung / Array 20 Messungen / Array Dauer ca. 120 min	ca. 5 min

In der Literatur wurde bis 2003 bisher nur ein System beschrieben, das zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln eine Kombination aus PCR und Hybridisierungsanalyse verwendet, ein so genannter PCR-ELISA. Das Verfahren beginnt ebenfalls mit der Amplifikation des CytB-Gens mittels Konsensus-PCR. Das PCR-Produkt wird immobilisiert (in der Regel in einer Mikrotiterplatte, evtl. auch auf Chips) und denaturiert. Die einzelsträngige, immobilisierte DNA wird mit tierartenspezifischen Sonden zur Reaktion gebracht. Es folgt die Detektion der Hybridisierung über eine Markierung der Sonde und die Bestimmung der An- oder Abwesenheit einer bestimmten tierischen DNA. Der Hybridisierungsschritt wird hier invers im Vergleich zum ICB-Biosensor oder den DNA-Chips durchgeführt, da hier das PCR-Produkt immobilisiert wird und danach eine Sonde zur Detektion zugegeben und hybridisiert wird. Der PCR-ELISA ist deutlich zeitaufwendiger als die Chipexperimente, da auf die Amplifikation noch die Immobilisierung der Proben-DNA und insbesondere diverse Inkubations- und Waschschriffe folgen. Für den Biosensor des ICB können hingegen, wie auch für konventionelle Chipexperimente, diverse Chips mit unterschiedlichen Sonden vorbereitet und gelagert werden. Bei Bedarf wird die Probe amplifiziert und direkt gemessen.