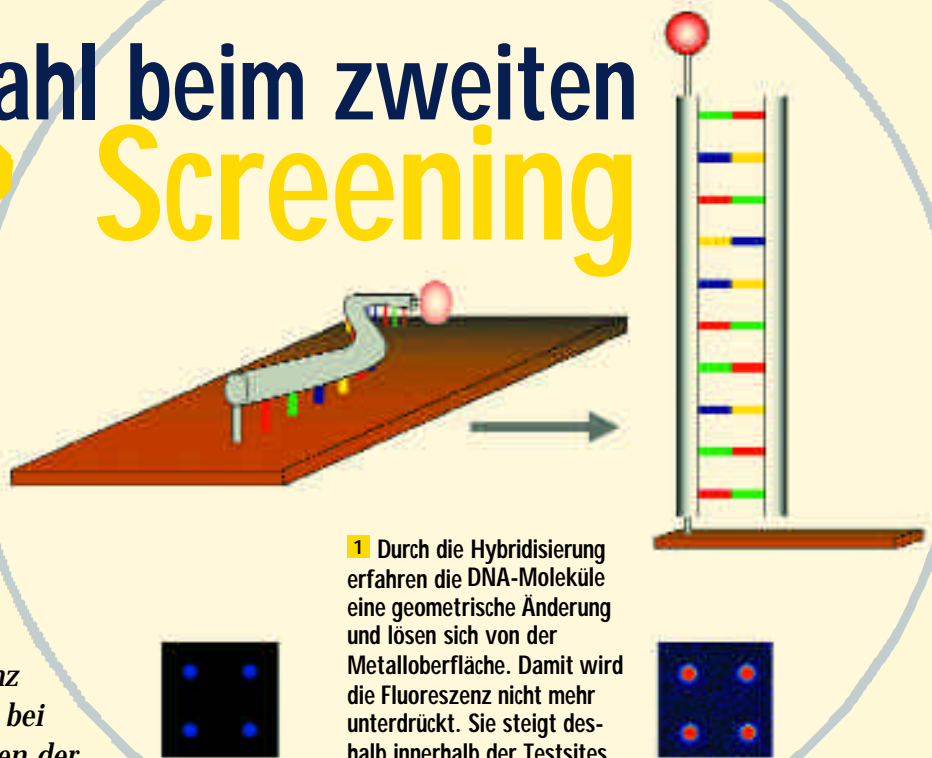


Die erste Wahl beim zweiten Screening

Die gängigen *Microarray-Technologien* basieren auf der *Fluoreszenz-Detektion* amplifizierter und *fluorophormarkierter Target-Sequenzen*. Noch sind die *Anwendungsmöglichkeiten* eingeschränkt, da die *geringe Verlässlichkeit*, *komplizierte Handhabung* und *hohe Kosten* Routine-Anwendungen bei *Genexpressions- und SNP-Analysen* verhindern. Die *TIFI-Technologie* von *Friz Biochem* ist eine auf *Fluoreszenz* basierende *Detektionsmethode* bei *DNA-Chips*, die ohne das *Markieren der Targetmoleküle* auskommt.

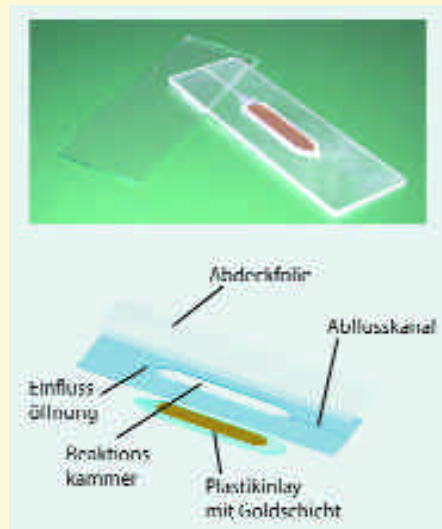


1 Durch die *Hybridisierung* erfahren die *DNA-Moleküle* eine *geometrische Änderung* und lösen sich von der *Metalloberfläche*. Damit wird die *Fluoreszenz* nicht mehr unterdrückt. Sie steigt deshalb innerhalb der *Testsites* deutlich an.

GERHARD HARTWICH*,
SABINE DUNTZE**

Die Tifi ("Target Induced Fluorescence Increase")-Technologie ist sensitiver und zugleich weniger arbeitsintensiv und fehleranfällig als die meisten dem derzeitigen Stand der Technik entsprechenden Fluoreszenz-Detektionstechnologien.

*Dr. G. Hartwich, FRIZ Biochem GmbH, 81477 München
**Dr. S. Duntze, b3c communications, 82152 Planegg



2 oben: Gekapselte Tifi-Chips im Vergleich zur Größe von üblichen Cover-Slides
unten: schematischer Aufbau der Tifi-Chips

Da bei der Tifi-Technologie keine Markierung der Targets notwendig ist, lassen sich Fehler vermeiden, die aus einer unspezifischen Fluoreszenz-Adsorption resultieren.

Tifi-Technologie

Friz Biochems Tifi-Technologie verwendet fluorophormarkierte, auf einer Metalloberfläche immobilisierte Sonden. Die Technologie beruht darauf, dass sich die Sonden in Einzelstrangform sehr nahe an der Metalloberfläche befinden und die Fluoreszenz durch das Metall gelöscht wird (Quenching).

Durch die Hybridisierung mit unmarkierten Targets ändert sich die geometrische Anordnung und der Fluorophor wird von der Metalloberfläche entfernt, wobei die Fluoreszenz eines Features im Fall einer Hybridisierung deutlich ansteigt (Abb. 1). Die Tifi-Chips können mit handelsüblichen Fluoreszenz-Readern ohne Umrüsten auf die Tifi-Technologie ausgelesen werden.

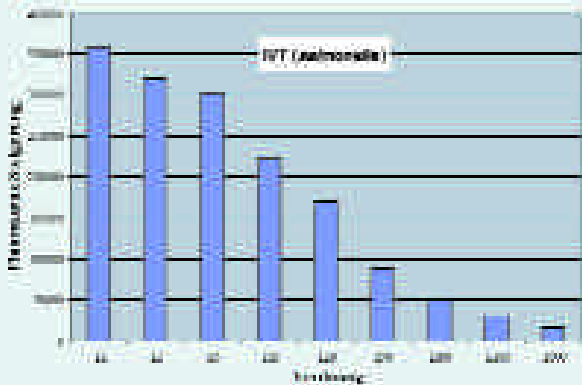
Microarray-Substrat und Spotting

Bei Friz Biochem werden zur Zeit Arrays mit 100 bis 2500 Spots pro cm^2 verwendet. Die Tifi-Chips bestehen aus einem Plastiksubstrat, das mit einer 200 nm starken und mit einem C-18 Alkanthiol-Monolayer passivierten Goldschicht überzogen ist. Ob-

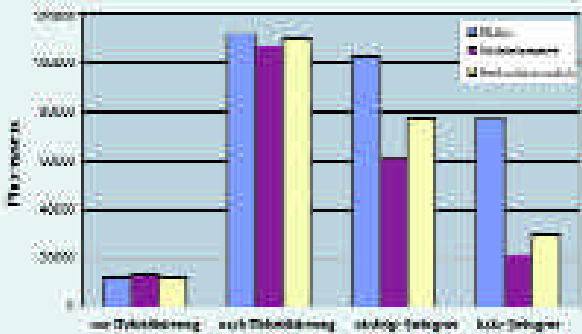
wohl die Tifi-Chips nur die Dimension eines Mikroskopie-Deckglases besitzen, handelt es sich um ein spülbares, gekapseltes System mit 30 μl aktivem Reaktionsvolumen, dessen Deckfolie eine – wie für Fluoreszenz-Messungen gefordert – sehr geringe Eigenfluoreszenz aufweist (Abb. 2).

Die Testsites der Chips werden im Abstand von 150 μm via Laserablation in den Alkanthiol-Monolayer eingebrannt, so dass hoch reine Goldspots für die Sondenimmobilisierung entstehen. Die Anbindung der Sonden erfolgt über einen proprietären Polythiolanker, der in der automatisierten Festphasensynthese an die Sonden-Oligonukleotide gekoppelt wird und eine hohe Stabilität der Sondenbindung gegenüber harschen Reaktionsbedingungen gewährleistet. Eine qualitativ und quantitativ reproduzierbare Immobilisierung der Sonden ist durch Friz Biochems Pseudo-Kontakt-Spotten gewährleistet, das eine hohe Spot-Homogenität erzeugt.

Durch die Optimierung der Anbindungsparameter wird eine gute Belegungsichte für maximale Hybridisierungseffizienz erreicht. Da der Zustand der immobilisierten Sonden-Oligonukleotide über die Messbedingungen so eingestellt werden kann, dass auch vor der Hybridisierung eine Restfluoreszenz zu



3 Verdünnungsreihe von Samonella in vitro Transkript (Ausgangsmaterial: 0,1 µg IVT in 100 µl Puffer), dargestellt als Fluoreszenzerhöhung nach der Hybridisierung



4 Mismatch-Sensitivität der Tifi-Chips bei Variation der Stringenzbedingungen (nach der Hybridisierung: 1 M NaCl, 30 °C; niedrige Stringenz: nach Waschen mit 100 mM NaCl, 30 °C; hohe Stringenz: nach Waschen 10 mM NaCl, 30 °C)

detektieren ist (vgl. Abb. 1), können direkte Referenzmessungen zur Qualitätskontrolle der Microarrays durchgeführt werden.

Vorteil: Hohe Sensitivität

Wie in den Abbildungen 3 und 4 illustriert, lassen sich mit der Tifi-Technologie bei 130 nm Spots positive Signale im dynamischen Bereich von zwei bis drei Logs nachweisen. Das Fluoreszenz-Signal eines einfachen Mismatches wird im Vergleich zum vollständig hybridisierten Target um etwa eine Größenordnung unterdrückt.

Das Detektionslimit liegt zur Zeit bei 107 Targets in einem Volumen von 100 µl, kann aber bei geringerer Spotgröße auf 105 Targets reduziert werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Sensitivität der Tifi-Chips nicht beeinflusst wird, wenn das passende Target in einem Probengemisch von 106 nicht-spezifischen Targetsequenzen vorliegt (nicht-spezifisch: Sequenzen mit mindestens einem Mismatch in mindestens gleicher Konzentration wie das passende Target).

Damit erlaubt die Tifi-Technologie sowohl die Detektion einer bestimmten Sequenz unter 106 verschiedenen Targets, als auch die Differenzierung von SNPs (Abb. 3, 4).

Vielzahl von Anwendungen

Die Tifi-Technologie ist nicht nur sensitiver als andere Fluoreszenz-Detektionssysteme, sondern auch weniger arbeitsintensiv und fehleranfällig, da die Targets nicht markiert und für viele Anwendungen nicht amplifiziert werden müssen. Bei Genexpressions-Analysen auf Medium-Density-Chips für "second screening" Anwendungen sind Tifi-Chips daher eine sinnvolle Alternative zu DNA-Chips anderer Hersteller.

Weitere Informationen über:

www.laborpraxis.de

- Darstellung der Tifi-Technologie
- Produkte & Service
- Die Oligosynthese bei Friz Biochem mit Kontaktmöglichkeit

Kennziffer: 000

Komplette Chips mit kundenspezifischen Sonden können bei Friz Biochem ab einem Auftragsvolumen von 100 Chips geordert werden. Für den Fall, dass der Kunde keinen Fluoreszenz-Reader besitzt, bietet Friz Biochem die Tifi-Technologie auch als Service an, bei dem der Kunde den Content der Chips definiert und die Proben Friz Biochem zur Analyse zur Verfügung stellt. **LP**