

## Multiplex Microarrays: neues Format für reproduzierbare und kostengünstige Assays

Irene Schwarz, Schott Nexterion, Mainz

► Microarrays werden hauptsächlich zur Charakterisierung ganzer Genome herangezogen, denn für die angewandte Forschung und klinischer Diagnostik sind sie bislang wegen hoher Kosten, fehlender Standardisierung und mangelnder Reproduzierbarkeit noch ungeeignet. In dem Maße aber, wie der Übergang von der Gen-Identifizierung (high-density Microarrays) zur Untersuchung der Genfunktion (low-density Microarrays) stattfindet, sind neue Microarray-Konzepte erforderlich, die diese Limitierungen beseitigen und damit die routinemäßige Anwendung erlauben. Ein viel versprechendes Konzept ist das Multiplexing, bei dem mehrere Microarrays auf einem einzigen Glasträger parallel durchgeführt werden können.

### Nexterion Slide MPX: Ein Multiplex-Chip

Multiplex Microarrays können mit dem MPX Format (Schott Nexterion) durchgeführt werden. Nexterion Slide MPX besteht aus einem beschichteten Glassubstrat, das mit Hilfe einer hydrophoben Schicht in verschiedene Hybridisierungswells unterteilt ist (Abb. 1). In diese Wells können identische oder unterschiedliche Arrays geprintet und anschließend mit dem Probenmaterial parallel untersucht werden. Die hydrophobe Schicht verhindert zusammen mit einer Superstruktur die Kontaminierung der benachbarten Wells mit den unterschiedlichen Target-Lösungen. Ein Sealing Film verhindert die Verdunstung der Proben. Slide MPX ist mit verschiedenen Beschichtungen (Amino-, Epoxy- und Aldehydgruppen) erhältlich und lässt sich mit gängigen Geräten für Microarraying prozessieren. Beta-Tests einer Hydrogel-Variante sind kürzlich begonnen worden.



Abb. 1: Nexterion Slide MPX-16 wird mit einer Superstruktur geliefert und ist kompatibel zu gängigen Microarray-Ausrüstungen.

### Kostengünstige Assays mit verbesserter Reproduzierbarkeit

Mit Slide MPX-16 können bis zu 16 verschiedene Assays auf einem Chip realisiert werden. Dadurch sind weniger Slides und Reagenzien für Labeling, Hybridisierung und Waschen notwendig. Die Kostenersparnis beträgt bis zu 80%, vergleicht man MPX-16 Slides mit normalen Slides (Abb. 2). Slide MPX-16 erlaubt das Printen von 10 bis 3000 Sonden pro Well. Die relativ geringe Sondendichte eignet sich damit für ein zweites Screening, wenn nach der Identifizierung eines Gens mit high-density Arrays Wissenschaftler an der Untersuchung der Genfunktion forschen. Alle Sub-Arrays werden in einem einzigen Durchgang geprintet und alle Target-Lösungen werden gleichzeitig hybridisiert. Dadurch unterliegen sämtliche Assays auf einem Multiplex-Chip identischen Reaktionsbedingungen wodurch die Reproduzierbarkeit bei Slide MPX im Vergleich zu herkömmlichen Slides erheblich erhöht wird.

### Weniger Target-Lösung

Die Gesamtfläche eines Nexterion Slide MPX-16 Wells ist etwa 40-mal geringer als die Gesamtfläche eines Wells auf einem 25x75 mm<sup>2</sup> Slide. Dadurch

ist weniger Hybridisierungsvolumen erforderlich, so dass höhere Target-Konzentrationen verwendet werden können. Wie Abbildung 3 zeigt, verstärken höhere Target-Konzentrationen die Signalintensitäten. Das vorhandene Target-Material kann für mehrere Experimente verwendet werden, ein Vorteil, der besonders bei limitiertem Target-Material wichtig sein kann.

### Anwendung

Nexterion Slide MPX ist für Toxikologie-Studien geeignet, wenn die Genexpression in Abhängigkeit von Dosierung und Zeit untersucht wird oder wenn genetische Variationen von verschiedenen Organen untersucht werden sollen. Eine andere Anwendung sind differentielle Expressions-Assays, die bei Slide MPX mit nur einer Farbmarkierung durchgeführt werden können. In einem Standard-Experiment müssen die Targets mit zwei Farbstoffen (Cy3, Cy5) markiert werden, die sich u.a. in der Markierungseffizienz unterscheiden und verschiedene Hintergrund-Intensitäten aufweisen. Da beim MPX Format mehrere One-Color-Assays auf einem einzigen Slide durchge-

### Cost Comparison

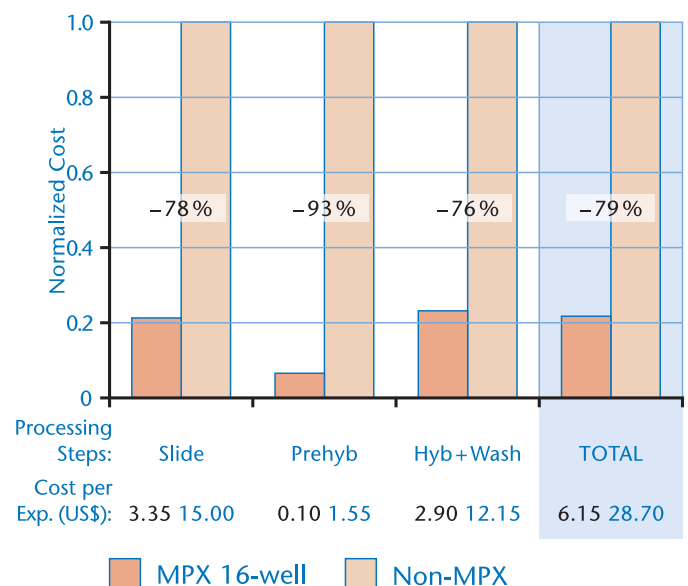


Abb. 2: Mit Nexterion MPX-16 werden die Kosten für Reagenzien um bis zu 80% reduziert.

Improved Sensitivity

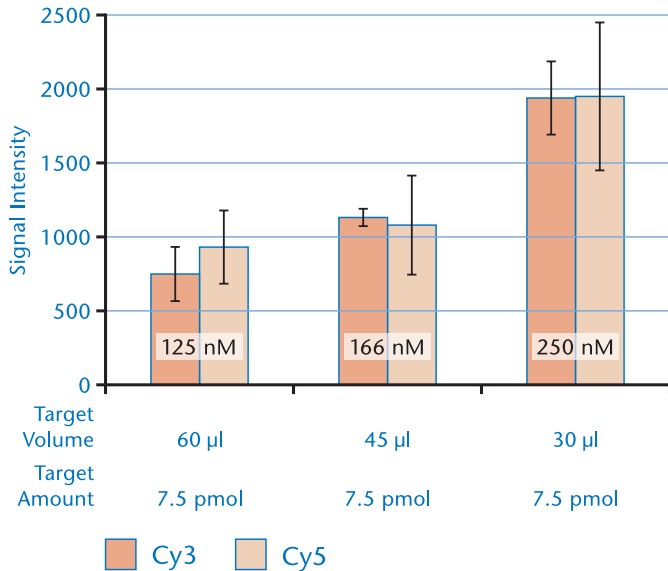


Abb. 3: Die Sensitivität von Microarray Assays wird durch höhere Target-Konzentrationen erhöht.

führt werden können, erhöht sich die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Experimente.

**Nexterion Slide MPX kann auch für Enzyme-Linked Immunosorbant Assays (ELISAs)**

herangezogen werden, da die Antikörper hervorragend auf den Epoxy- und Aldehydbeschichtungen von Slide MPX immobilisiert werden können und die meisten diagnostischen Proteinassays eine geringe Probendichte erfordern.

Slides MPX können sogar für HTS-Screening Assays in der bakteriellen Diagnostik und zur Detektion von Pathogenen über pathogenspezifische DNA-Sequenzen herangezogen werden. Das MPX-16 Format ist für das Hochdurchsatz-Screening sehr gut geeignet, da es sich mittels eines speziellen Trays mit gängigen Liquid Handling Instrumenten im Mikrotiterplatten-Format 96 und 384 prozessieren lässt.

**Schlussfolgerung**

Nexterion Slide MPX-16 ist ein erster Schritt in Richtung Multiplexing, der es Wissenschaftlern

und Biotechnologie-Firmen erlaubt, mit den bereits vorhandenen Geräten für Printing, Liquid Handling und Scanning von einfachen Microarray Assays zu multiplex Assays zu wechseln. Weitere Verbesserungen bei der Automatisierung werden erforderlich sein, um auf einen größeren Durchsatz, wie beispielsweise bei Mikrotiterplatten, zu kommen, die für die angewandte Wissenschaft und klinische Diagnostik gebraucht werden.

**Korrespondenzadresse:**

**Schott nexterion**  
 Irene Schwarz  
 Hattenbergstr. 10  
 D-55122 Mainz  
 Tel.: 06131-66-2746  
 Fax: 06131-66-1717  
 info.nexterion@schott.com  
 www.schott.com/nexterion

Wir haben auf Schott MPX-Slides Hybridisierungen von Oligomikroarrays mit der Hybridisierungsstation SlideBooster durchgeführt. Als Modellsystem diente ein Chip mit 50 Genen der Ralte, auf dem jedes Gen durch 50 Nukleotide lange Oligos repräsentiert wurde. Alle Oligonukleotide wurden in Duplikaten gespottet. Durch Mischen der Hybridisierungslösung im SlideBooster während der Inkubation konnte das Signal-Rausch-Verhältnis um etwa einen Faktor zwei gegenüber der Mischung in einem Schüttler erhöht werden. Die Variationen zwischen den Duplikaten in einem Well und zwischen den einzelnen Wells konnten im Vergleich zu einem Schüttler verringert werden. Mit dem SlideBooster war es möglich, die MPX-Slides ohne „Superstructure“ und „Sealstrips“ zu hybridisieren, was die Handhabung deutlich vereinfacht.“

**Roland Kirchner, Advalytix AG, Brunthal b. München, Kontakt: kirchner@advalytix.de**

„Das Schlüsselproblem der heutigen Protein-Microarraytechnologie ist eine viel zu niedrige Empfindlichkeit, die deren breitere Anwendung momentan noch stark eingrenzt. Wichtig ist insbesondere eine effiziente, gegen Proteinadsorption resistente Oberflächenchemie. Nach unserer mehrjährigen Erfahrung in der Analyse von eigenen und kommerziellen chemischen Beschichtungen ist die Epoxy-Silanisierung der Glasslide-Oberflächen eine der sensitivsten, zuverlässigsten und auch kostengünstigsten Verfahren für die Herstellung von Protein Microarrays. Nach unseren Einschätzungen erlaubt diese Glasslide Beschichtung weit mehr als 10<sup>5</sup> Antikörper-Moleküle pro µm<sup>2</sup> zu immobilisieren. Es ist hier zu betonen, dass unsere Tests auf wesentlich längere Inkubationszeiten als die üblichen 1-2 Stunden ausgerichtet sind. Der Grund dafür ist eine sehr langsame, stark diffusionsabhängige Kinetik der Protein-Protein Interaktion auf Microarray, die unter suboptimalen Inkubationsbedingungen, wie z.B. bei Verwendung von Coverslips, besonders problematisch ist. Demzufolge bieten die Epoxysilane- MPX Slides von Schott-Nexterion, die zusätzlich mit quadratischen Inkubationskammern versehen sind, eine optimale Lösung für eine unbehinderte Signalentwicklung auf einer der heutzutage sensitivsten Oberflächen. Eine Inkubation dieses Systems auf dem SlideBooster von Advalytix ermöglichte uns auf einem Antikörperarray, Antigene bis zu einer Konzentration von einem fM zu detektieren. Diese Zahl spricht für sich selbst“.

**Wlad Kusnezow und Christoph Schröder, Functional Genome Analysis, DKFZ Heidelberg**  
 Kontakt: w.kusnezow@dkfz.de