

Sven Ingebrandt,
Andreas Offenhäuser,
Fahri Uslu

Elektronischer Nachweis von DNA Hybridisierung

Markierungsfreies, vollelektronisches DNA Sensorsystem auf der Basis von Feldeffekt-Transistoren

Die Entwicklung von diagnostischen Methoden auf der Basis von Mikroarrays, bekannt als DANNDNA- oder Gen-Chips, wird in Zukunft in vielen Bereichen der Medizin neue Möglichkeiten eröffnen. Es wird erwartet, dass man damit schnell und preiswert genetisch nachweisbare Erkrankungen wie AIDS, Alzheimer, Cystofibrosis sowie manche Form von Krebs diagnostizieren und auch den Verlauf von Therapien begleiten kann. Bevor aber diese Visionen Wirklichkeit werden können, müssen noch viele technische Probleme gelöst werden. Zurzeit basieren die meisten DNA-Chips auf Fluoreszenzmarkierungen oder radioaktiver Markierung in Verbindung mit entsprechenden Widerstandsmessungen und Feldeffektmessungen für die Detektion der Biomoleküle untersucht. Beide Methoden machen sich dabei eine natürliche Eigenschaft der DNA zunutze: das DNA-Molekül ist aufgrund seines molekularen Aufbaus in einer schwachen Salzlösung, wie sie auch im Inneren einer lebenden Zelle vorherrscht, leicht negativ geladen. In der Folge wird bei Anlagerung der Moleküle an eine Sensoroberfläche diese leicht negativ geladen. Kann man diese Ladung nachweisen, so kann DNA ohne zusätzlichen Markierungsschritt nachgewiesen werden. Unsere Arbeitsgruppe am Forschungszentrum Jülich arbeitet an einem Verfahren, die Anlagerung von DNA an eine Oberfläche mit Hilfe von Halbleiterchips auf der Basis von Feldeffekttransistoren nachzuweisen. Diese Methode eröffnet die Möglichkeit einer direkten und markierungsfreien Detektion von spezifischen DNA-Sequenzen direkt im Elektrolyten. Im Vergleich zu klassischen Nachweismethoden können damit mehrere Aufbereitungsschritte eingespart werden. Durch weitere Miniaturisierung

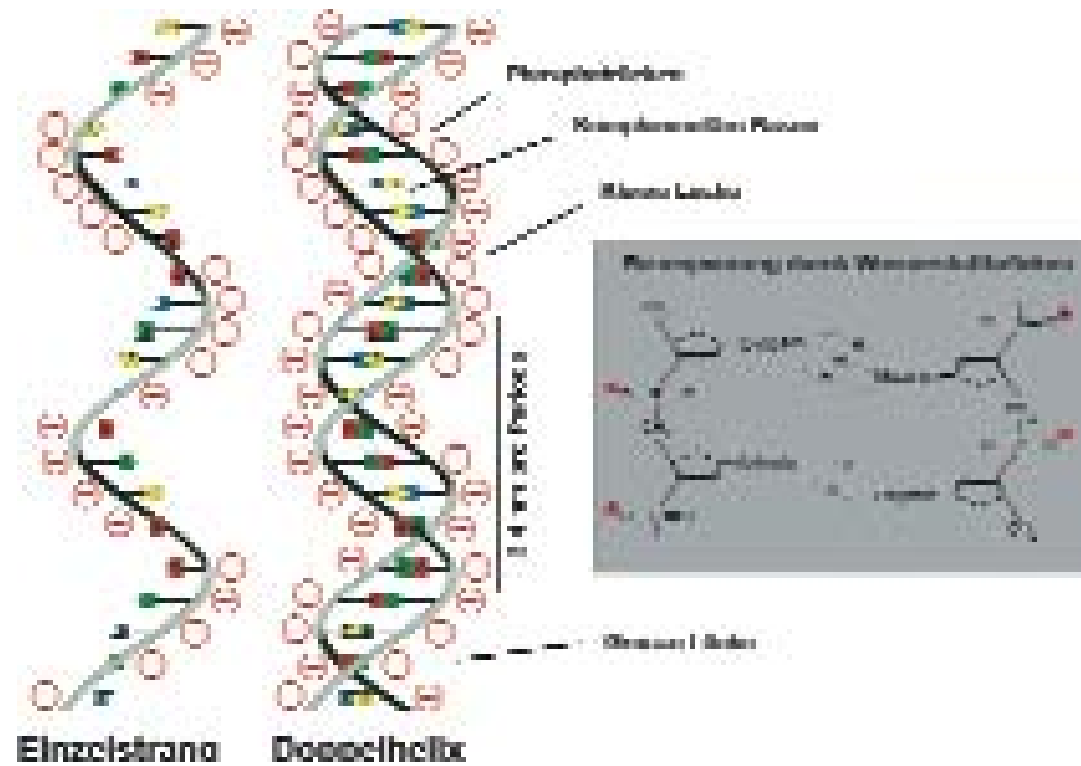


Bild 1: Schematischer Aufbau der DNA Doppelhelix. Der so genannte Phosphatrücken setzt sich aus einer Abfolge von negativ geladener Phosphatgruppe und einem Zuckerring zusammen. An diesem Ring befinden sich die vier Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin, die in der Doppelhelix ins Zentrum gerichtet sind.

der Sensorenchips steht zusätzlich ein gewaltiges technisches Potenzial zur Verfügung.

Die Detektion von DNA-Molekülen in der Biotechnologie und der medizinischen Diagnostik wird weltweit in vielen verschiedenen Forschergruppen vorangetrieben. Dafür hat die Molekularbiologie schon vor Jahren die Grundlagen geschaffen, die es erlauben, Kopien von Nukleinsäure-Proben anzufertigen und nachzuweisen. Die meisten der klassischen Methoden benutzen zur DNA-Sequenzierung, also zur Aufklärung der Abfolge der vier verschiedenen Basen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C) in einem Einzelstrang, das Konzept der DNA-Hybridisierung (Bild 1). Hierbei werden bekannte, synthetisch hergestellte, einzelsträngige DNA-

Moleküle von definierter Länge (meist 20 Basen pro Molekül (bp)) auf einer Oberfläche verankert. Dabei werden so genannte DNA-Spotter eingesetzt. Sie sind in der Lage, robotergetrieben viele verschiedene DNA-Tröpfchen auf einer Fläche von wenigen Quadratzentimetern (rund 2500 verschiedene DNA-Proben auf einem Quadratzentimeter ist aktueller Standard) aufzubringen. Diese Tröpfchen auf einem DNA-Chip haben einen Durchmesser von etwa 100 Mikrometer, wobei sich durch eine geeignete Oberflächenchemie circa 80 Millionen DNA-Moleküle (20bp Einzelstränge) auf dieser kleinen Fläche immobilisieren lassen. Für die DNA-

Analyse wird DNA aus einer Blut- oder Speichelprobe gewonnen und gereinigt, durch Aufkochen über die kritische Schmelztemperatur der DNA in Einzelstränge aufgetrennt und durch Enzyme in kleinere Moleküle mit 20 bp Länge zurechtgeschnitten. In den meisten Fällen wird die DNA amplifiziert, also durch das Konzept der Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt. Dieser Schritt ist notwendig, um genügend DNA zur Analyse zur Verfügung stellen zu können. Die DNA-Probe wird dann auf den DNA-Chip gegeben, wo die entsprechenden DNA-Moleküle aufgrund der starken chemischen Wechselwirkung sich an auf der Oberfläche immobilisierten, komplementären Strängen anlagert.

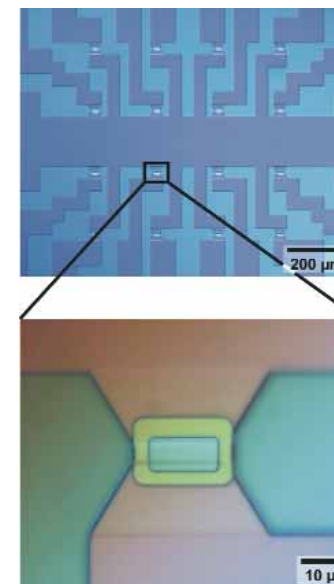


Bild 2: Im oberen Bild ist das Layout der Oberfläche des Siliziumchips mit einem Feld von 4x4 einzelnen adressierbaren Transistorstrukturen im Abstand von 200 µm zu sehen. Eine Vergrößerung zeigt die planare Struktur eines einzelnen Transistorgates (die sensitive Fläche ist ein Teil des kleinsten Rechtecks in der Bildmitte) mit typischen Größen von 1x16 oder 1.5x16 µm².

Die Hybridisierungsreaktion auf der Oberfläche kann nun mit einer Vielzahl von Methoden nachgewiesen werden. Für die meisten dieser Detektierungsprinzipien ist jedoch ein Markierungsschritt (zum Beispiel mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem radioaktiven Molekül) des immobilisierten oder des zu detektierenden DNA-Strangs zwingend notwendig. Techniken, die einen solchen Markierungsschritt vermeiden, basieren in der Regel auf dem direkten Nachweis der natürlichen negativen Ladung des DNA Moleküls (Bild 1). Wir setzen auch dieses Nachweisprinzip ein, für

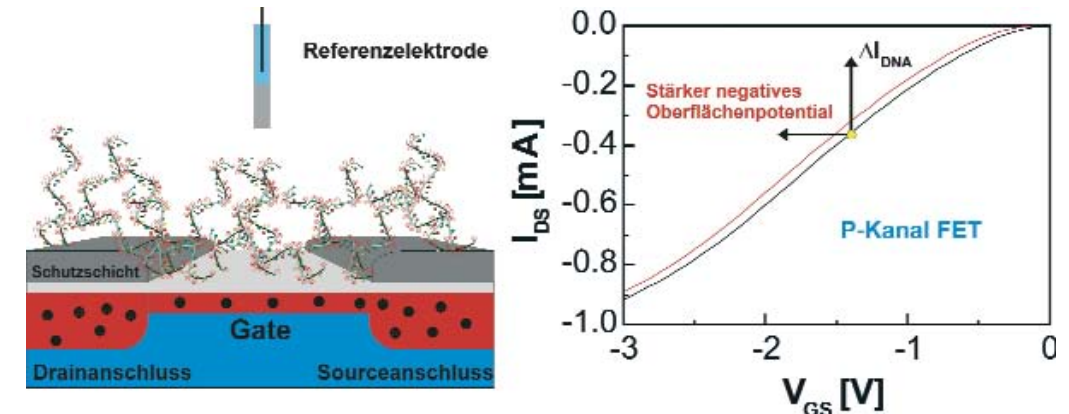


Bild 3: Funktionsprinzip der elektronischen DNA-Detektion: lagert sich die negativ geladene DNA an der Gateoberfläche einer Transistorstruktur an (links), so verschiebt sich die elektrische Kennlinie des Transistors leicht. Diese Verschiebung der Kennlinie wirkt sich in einem etwas kleinerem elektrischen Strom durch den Transistor aus (vom Source- zum Drainanschluss).

das wir als Sensoren Feldeffekt-Transistoren verwenden. Feldeffekttransistoren (FET) sind Bauelemente, welche in der Informationstechnologie als elektronische Schalter eingesetzt werden. Der FET hat 3 Anschlüsse, Source (Zufluss, Quelle), Gate (Steuertor) und Drain (Abfluss). Durch ein elektrisches Feld, hervorgerufen durch eine Steuerspannung zwischen Gate und Source, wird die Leitfähigkeit des Source-Drain-Kanals des Feldeffekt-Transistors beeinflusst. Die Leitfähigkeit des Source-Drain-Kanals kann auch durch auf das Gate aufgebrachte Ladungen beeinflusst werden. Der Transistorchip und das Layout der Sensoroberfläche ist in Bild 2 dargestellt.

Lagern sich die negativ geladenen DNA Moleküle auf der Ga-

te-Oberfläche an, so verändert sich die so genannte Flachbandspannung des Transistors, was sich wiederum in einer leicht verschobenen Kennlinie bemerkbar macht (Bild 3). Hält man die Steuerspannungen des Transistors fest, so resultiert dies wiederum in einem etwas geringeren Strom durch die Transistorstruktur. Damit kann man auf die effektive Potenzialänderung am Gatekontakt zurückrechnen. In zeitaufgelösten Messungen, bei denen das Oberflächenpotential über lange Zeiträume aufgezeichnet wird, können die Immobilisierung und die Hybridisierung von unmarkierter

DNA an der Oberfläche nachverfolgt werden.

Die Oberfläche der Sensorchips wird für die bessere Anlagerung der DNA-Stränge chemisch modifiziert. Durch diese Behandlung bildet sich eine dünne Schicht von Aminosilan auf der Chipoberfläche, die durch die freien Aminogruppen im Elektrolyten positiv geladen ist. Die elektrostatische Wechselwirkung (Coulombkraft) unterstützt die Immobilisierung der DNA, sodass die Immobilisierungssignale recht schnell (zwei bis fünf Minuten) im Vergleich zu den Signalen der Hybridisierung (> 1h) sind.

In Referenzmessungen mit einem Fluoreszenzmikroskop konnte eine gleichmäßige Belegung der Chipoberfläche nachgewiesen werden (Bild 4). Zusätzlich wurde

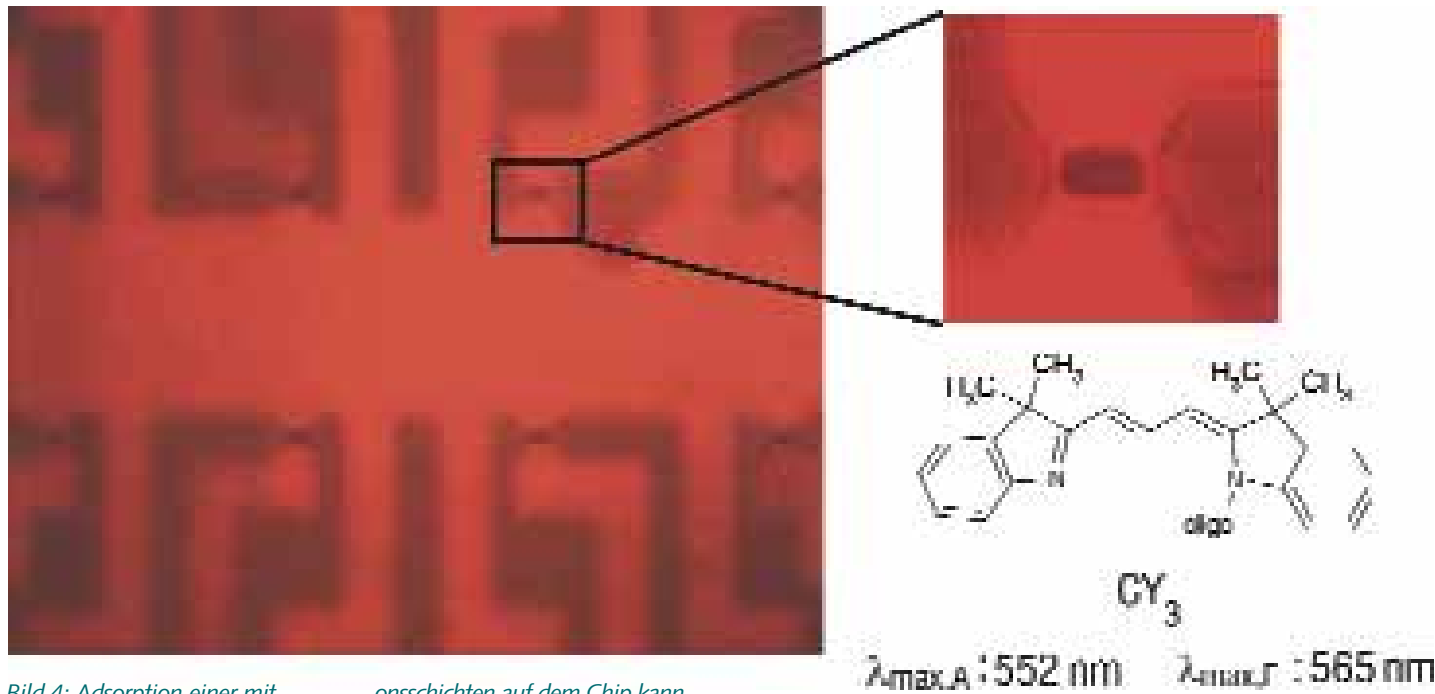
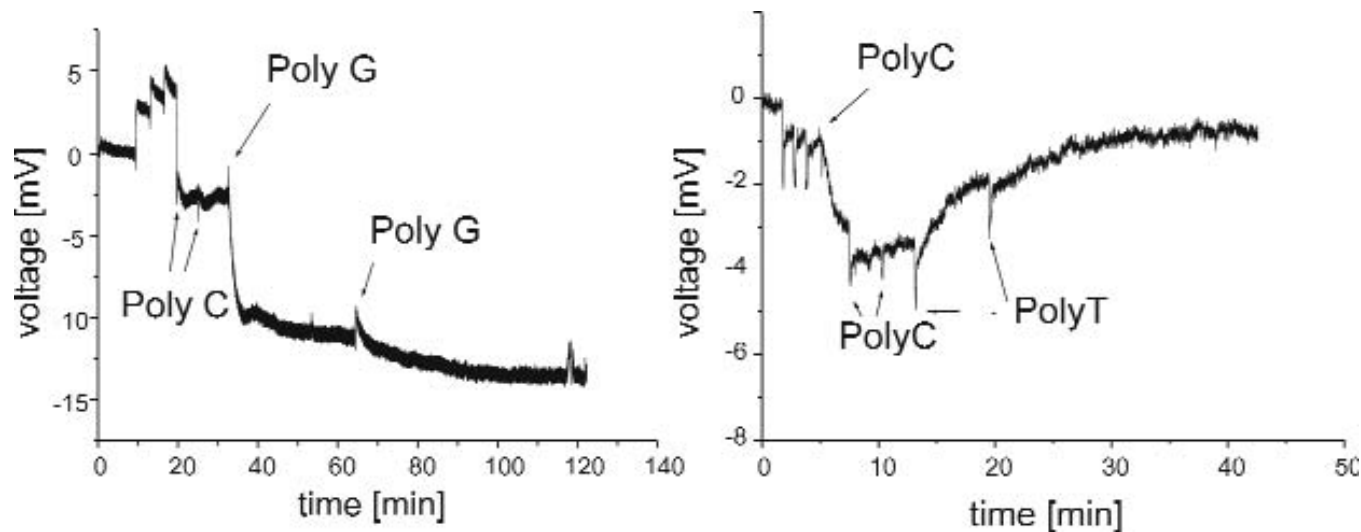


Bild 4: Adsorption einer mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy-3 markierten DNA Probe auf einer mit Aminosilan modifizierten Sensoroberfläche. Die Fluoreszenzintensität hängt vom Abstand des Farbstoffes von der Siliziumoberfläche ab. Wegen der unterschiedlichen Dicken der Isolati-

onsschichten auf dem Chip kann man das Layout des Sensors wiedererkennen (vgl. Bild 2). An Stellen mit gleicher Isolations-schichtdicke erhält man aber eine gleichförmige Intensität, was auf eine gleichmäßige Immobilisierung der DNA-Proben schließen lässt.



eine Oberflächenbelegung von 4×10^{15} DNA (20-mer) pro Quadratmeter auf den mit Aminosilan modifizierten Sensoroberflächen mittels radioaktiv markierter DNA bestimmt, was vergleichbar mit in der Literatur angegebenen Werten ist. Besonders interessant fällt jedoch der Vergleich aus, der die Detektionsflächen unserer Transistorflächen (ca. $8 - 30 \mu\text{m}^2$) mit den typischen Größen von DNA Spots der Fluoreszenzchips (ca. $8000 \mu\text{m}^2$) berücksichtigt: für unsere Transistoren genügen circa 100.000 DNA-Stränge auf der sensitiven Fläche zur Signalgenerierung während bei den Fluoreszenzchips rund 80 Millionen DNA-Stränge benötigt sind. Für die elektronische Detektion kann dieser Wert weiter verringert werden, da die Mikroelektronik noch

ein weit größeres Miniaturisierungspotential besitzt. Der Einfluss des pH-Wertes und der Kochsalzkonzentration in der Elektrolytlösung auf die Größe der FET-Signale wurde im Rahmen dieses Projekts untersucht. Die erfolgreichsten Messungen wurden in der folgenden Pufferlösung durchgeführt: 10 mM TRIS ((Hydroxymethyl-) Aminomethan), 1 mM EDTA, 1 mM NaCl bei einem pH Wert von 8. Die Signale, die man aus Experimenten mit komplementären Basensträngen erhält, lassen sich klar von Signalen unterscheiden, bei denen die Basen der Halbst-ränge nicht zueinander passen, also komplett nicht komplementär sind (Bild 5). Zur Detektion von Punktmutationen (eine Basenpaarung in einem natürlichen

Bild 5: Auf der linken Seite ist eine Messung eines erfolgreichen Immobilisierungs- und Hybridisierungsexperimentes gezeigt. Es wurde eine 45bp PolyC Probe auf der Oberfläche immobilisiert und danach eine komplementäre 45bp PolyG Probe in den Reaktionsraum eingebracht und ein klares Hybridisierungssignal detektiert. Auf der rechten Seite erkennt man, dass solche Signale klar von Experimenten mit absolut nicht passenden Proben (PolyC mit PolyT) unterschieden werden können.

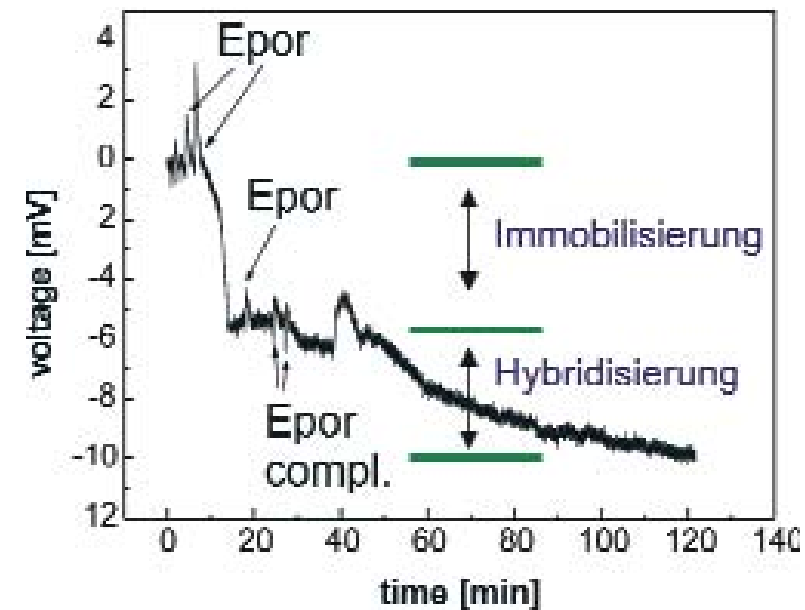


Bild 6: Detektion von Immobilisierungs- und Hybridisierungssignalen der natürlichen Sequenz EpoR Rezeptors (Erythropoietin (Epo) receptor (R): 5-GGACACC-TAC-TTGGTATTGG-3 + compl.). Die Signalstärke ist ca. 4-6 mV, was sich klar vom Rauschunte

20bp DNA-Doppelstrang passt nicht) muss die Sensitivität des Systems jedoch noch weiter gesteigert werden. Ein System mit einer solchen Empfindlichkeit wäre dann in den der Genanalyse einsetzbar. Grundsätzlich funktionierte aber in unseren Experimenten die Detektion von natürlichen Sequenzen besser als die Detektion von Polybasenproben (Bild 6).

Ein möglicher Ansatz zur Steigerung der Sensitivität ist die Durchführung von so genannten Differenzmessungen. Dafür muss durch ein Spottingverfahren auf die verschiedenen Gatebereiche eines Chips eine unterschiedliche DNA immobilisiert werden und die Differenz der beiden Signal bestimmt werden. Damit wird man unabhängig von Temperatur- und Elektrolyteinflüssen. Das wohl größte Verbesserungspotential steckt aber in der geplanten Miniaturisierung des Transistors, dessen Dimensionen sich dann im Bereich von einzelnen DNA Molekülen bewegen wird. Mit diesen Ansätzen wird es in Zukunft möglich sein, ein schnelles, zuverlässiges, markierungs- und PCR-freies, vollelektronisches DNA Detektorsystem herzustellen. Diese

Methode wird ein sehr vielfältiges System für eine breite Palette an biologischen Fragestellungen zur Verfügung stellen. Die Autoren möchten sich bei Dr. Simone Böcker-Meffert, Dr. Dirk Mayer und Dr. Holger Ecken (alle ISG-2), sowie bei Dr. Margarate Odenthal, Institut für Pathologie an der Universität Köln, für die tatkräftige Hilfe während des Projekts bedanken.