

Hyperspektrale Analyse mehrfach fluoreszenzmarkierter gentechnischer Biochips

F. Erfurth¹, B. Nyuyki¹, B. Seme¹, H.P. Saluz², E. Gutmann¹

¹ GMBU e.V. Jena, Fachsektion Photonik und Sensorik, Felsbachstr. 7, 07745 Jena,

² Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. Hans-Knöll-Institut (HKI), Beutenbergstr. 11a, 07745 Jena

Biochips dienen dazu, gezielt bestimmte Moleküle in einer Lösung zu identifizieren und stellen in der Biologie wichtige Instrumente zur Miniaturisierung und Automatisierung dar. Sie bestehen aus einem festen Trägermaterial, beispielsweise einem Mikroskop-Objektträger, mit darauf verankerten und als Sonde fungierenden Biomolekülen. DNS-Biochips nutzen einzelsträngige DNS als Sonde zum Nachweis komplementärer DNS, beispielsweise von genetisch modifizierten Mikroorganismen. Dabei werden die auf dem Träger immobilisierten Oligonukleotid-Sonden mit einer Lösung umspült, welche die zu untersuchende DNS enthält. Diese markiert man zuvor mit einem fluoreszierenden Farbstoff. Ob eine erfolgreiche Reaktion stattfindet, erkennt man am Ende daran, ob an einer bestimmten Stelle auf dem Biochip fluoreszierender Farbstoff zu finden ist.

Obwohl die Technologien zur Biochip-Herstellung seit Jahren optimiert werden, schränken verschiedene Faktoren die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der darauf basierenden molekularbiologischen Methoden ein. Beispielsweise entstehen im Herstellungsprozess Artefakte zwischen oder auf Proben. Unerwünschte Fluoreszenz von Trägermaterial, Staub oder Prozessmitteln überlagern die Emission des Fluoreszenz-Markers und können zu Fehlinterpretationen führen. Außerdem können Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und Gen das Fluoreszenzsignal beeinträchtigen. Herkömmliche Fluoreszenz-Scanner erlauben in der Regel keine Trennung dieser Störungen vom Signal des markierenden Farbstoffs.

Einen Ausweg hierfür stellt die Auswertung von Biochips mit hyperspektraler Bildgebung dar. Diese kann als eine Kombination der herkömmlichen digitalen Bildverarbeitung und der klassischen Spektroskopie angesehen werden. Sie vereint beide Verfahren derart, dass für jeden Punkt des aufgenommenen Objektes die gesamte spektrale Information zur Verfügung steht. Der von der GMBU e.V. entwickelte hyperspektrale Biochip-Scanner nutzt diese Technologie, was für die Biochip-Analyse mehrere Vorteile gegenüber herkömmlichen Microarray-Scannern bietet: eine größere Anzahl unterscheidbarer Farbstoffe, die Erkennung und Berücksichtigung von Verunreinigungen sowie die parallele Aufnahme vieler Messpunkte. Vorteile entstehen bei der hyperspektralen Bildaufnahme jedoch erst in Verbindung mit geeigneten multivariaten Auswertemethoden. Durch rechnerische Entmischung der überlagerten Fluoreszenzspektren lassen sich die beteiligten Stoffe weitgehend trennen.

Für praxisnahe Untersuchungen wurden spezielle Biochips mit vierfach farbstoffmarkierten Oligonukleotiden hergestellt. Die Emissionsspektren der eingesetzten, weit verbreiteten, Cyanin-Marker überlappen z.T. stark. Trotzdem konnte die Trennung und Quantifizierung der Fluoreszenz-Marker, sowie von weiteren Fluoreszenzquellen des Biochips demonstriert werden.