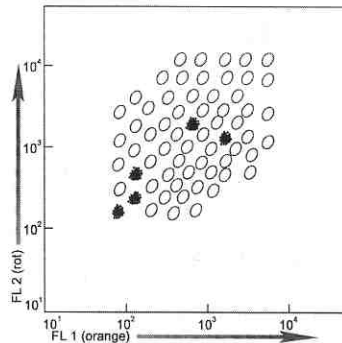


# Multiplex DNA- und RNA-Analyse an fluoreszenten Microbeads als Alternative zum DNA-Array

Karl J. Lackner, Jochen Kilwinski, Thomas Langmann, Charalampos Aslanidis, Gerd Schmitz

Institut für Klinische Chemie  
und Laboratoriumsmedizin  
Klinikum der Universität Regensburg



**Abb 1**  
Schematische Darstellung der Auftrennung der Microbeadpopulationen im Durchflußzytometer. Bei Verwendung von drei Farben zur Differenzierung der Microbeads ist eine entsprechend höhere Anzahl von Beadpopulationen möglich.

**Abb 2**  
Prinzip der Beadpopulationen, die mit einem Oligonukleotid I... gekoppelt sind. In der Durchflußzytometrie werden diese Beadpopulationen nacheinander detektiert. Zunächst wird die Konzentration der Beadpopulationen gemittelt, bevor die nächsten Beadpopulationen detektiert werden.

## Zusammenfassung

Konventionelle DNA- und Oligonukleotid-Arrays bestehen aus einer unterschiedlichen Zahl räumlich angeordneter Nukleinsäure-Spots. Sie können zur Sequenzüberprüfung, zum Genexpressionsmonitoring und anderen Zwecken eingesetzt werden. Die Produktion von Arrays in kleinen Zahlen für spezifische Fragestellungen kann allerdings sehr aufwendig und teuer sein. Außerdem sind High-Density Arrays für viele Zwecke in der Diagnostik nicht erforderlich. Eine interessante Alternative könnten Suspensionsarrays sein, die aus einer Reihe individuell fluoreszent markierter Mikrobeads bestehen. Diese können durchflußzytometrisch separiert und identifiziert werden. Die Beads dienen als Matrix für Hybridisierungsassays, können aber auch für Immunoassays verwendet werden. Im Vierfarb-Durchflußzytometer können ca. 600-800 verschiedene Beadpopulationen abgegrenzt und in Hybridisierungsassays eingesetzt werden. Diese Zahl unterschiedlicher DNA- bzw. Oligonukleotidsonden entspricht einem Array mittlerer Dichte und dürfte für die meisten klinisch-diagnostischen Fragestellungen ausreichend sein.

### Schlüsselwörter

Multiplex DNA-Analyse; DNA-Array; Durchflußzytometrie

## Summary

### Multiplex DNA- and RNA-Analysis Using Fluorescent Microbeads as an Alternative to DNA-Arrays

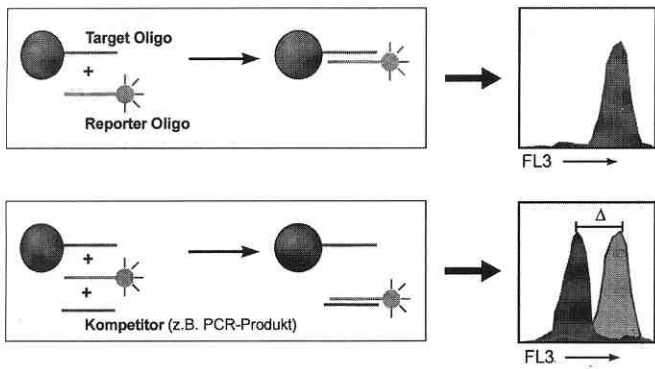
Conventional DNA- or oligonucleotide-arrays consist of variable numbers of spatially separated nucleic acid spots. They may be used for sequence verification, expression profiling and other purposes. However, production of customized arrays is expensive, and for many clinical diagnostic purposes there is no need for high density arrays. An interesting alternative are „suspension arrays“ which represent a spectrally separated range of microbeads which can be identified by flow cytometry. These beads may serve as a matrix for hybridization assays as well as immunoassays and others. Using four colour flow cytometry up to approx. 600-800 separate bead populations can be discriminated and used for hybridization assays. This number of specifications compares with intermediate density solid phase arrays and will be sufficient for most diagnostic purposes.

### Key words

Multiplex DNA-analysis, DNA-array, flow cytometry

Die Weiterentwicklung molekularbiologischer Diagnostik hängt von der Entwicklung robuster, automatisierbarer Technologien ab (1). Derzeit stehen neben konventionellen Methoden homogene Amplifikationsverfahren zur Verfügung, die mit Hilfe von DNA-Fluoreszenzfarbstoffen bzw. Energietransfer-sonden die Detektion des Amplikons und über Hybridisierungsverfahren auch den Nachweis einzelner Mutationen erlauben. Auf der anderen Seite stehen DNA-Arrays unterschiedlicher Dichte, die Sequenz- und Genexpressionsanalysen in kürzester Zeit möglich machen. Diese setzen in der Regel spezifische Geräte voraus (2). Ihre Möglichkeiten übersteigen die Erfordernisse der klinischen Routine häufig bei weitem.

Eine interessante Alternative stellt ein neues Verfahren der Firma Luminex (Austin, Texas) dar, das auf der Hybridisierung an fluoreszenzmarkierte Beads beruht, die nach Inkubation im Durchflußzytometer vermessen werden (3,4). Basis dieser Analytik sind Microbeads, die in verschiedenen Intensitäten mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Auf diese Weise entstehen diskrete Bead-Populationen, die im Durchflußzytometer identifiziert werden (Abb 1). Die mögliche Anzahl diskreter Populationen hängt von den verfügbaren Farbstoffen und Techniken zur Markierung der Beads sowie von der Anzahl unterscheidbarer Farben im Durchflußzytometer ab. Momentan sind mit zwei Farben 64 verschiedene Beads verfügbar. Diese Zahl kann aber durch eine weitere Farbe leicht auf >500 erhöht werden. An die Beads wer-


**Abb 2**

Prinzip des kompetitiven Hybridisierungsassays. An eine individuelle Microbeadpopulation wird ein Oligonukleotid kovalent oder über Biotin-Streptavidin gekoppelt. Es wird dann mit einem fluoreszenzmarkierten Reporteroligonukleotid hybridisiert. Die Bindung des Reporteroligonukleotids wird im Durchflußzytometer als durchschnittliche Fluoreszenz in dem entsprechenden Kanal detektiert. In einem zweiten Ansatz wird das Reporteroligonukleotid zunächst mit einem Kompetitor inkubiert, dabei werden Reporteroleküle an den Kompetitor gebunden, die dann nicht mehr zur Hybridisierung an die Microbeads zur Verfügung stehen. Im Ergebnis kommt es zur Abnahme der mittleren Fluoreszenz. Diese wird als % Inhibition vom Ausgangswert angegeben.

den in einem nächsten Schritt Oligonukleotide nach Wahl des Untersuchers gekoppelt, so daß jeder Bead-Population ein spezifisches Oligonukleotid zugeordnet werden kann. In einer Suspensionshybridisierung können nun mit einer von den Beads unterschiedlichen Fluoreszenz (z.B. FITC) markierte Amplikons direkt oder unmarkierte Amplikons in einer kompetitiven Hybridisierung an die an den Beads als Festphase immobilisierten Nucleinsäuren hybridisieren (Abb 2). Die Auswertung erfolgt im Durchflußzytometer anhand der Intensität der Fluoreszenz des DNA-Labels in der Bead-Population, wofür ein weiterer Fluoreszenzkanal benötigt wird. Ein konventionelles Durchflußzytometer (z.B. FACScan) mit drei Fluoreszenzkanälen kann also zwei Bead-Farben zur Klassifizierung der Beads und eine Reporterfarbe zum Nachweis der Hybridisierungsintensität unterscheiden. Ein FACSCalibur könnte entsprechend drei Bead-Fluoreszenzen diskriminieren. Die entsprechende Software für die beiden Gerätetypen kann nachgerüstet werden. Darüberhinaus steht seit kurzem mit dem Luminex 100 ein dediziertes Gerät zur Verfügung, das ausschließlich für die Analyse der Microbeads konzipiert wurde.

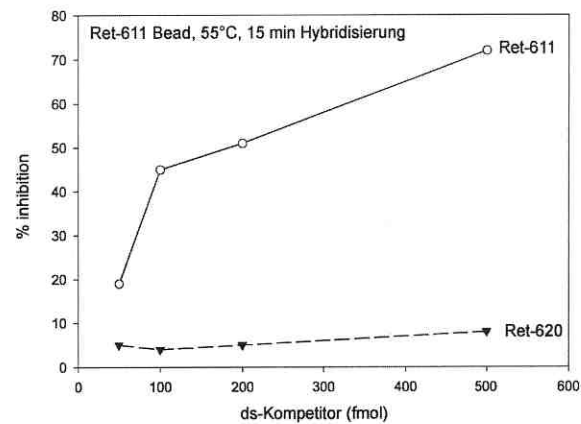
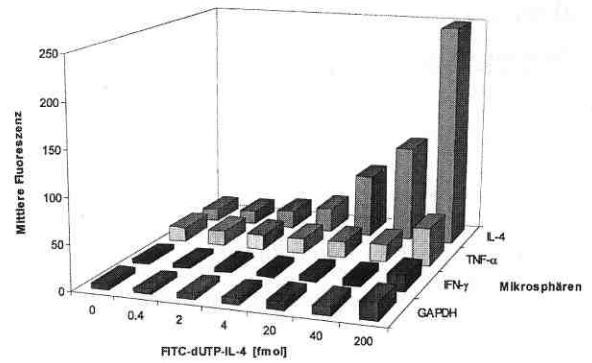
Erste Ergebnisse zum Expressionsmonitoring und zur Mutationsanalyse sind in Abbildungen 3 und 4 dargestellt. Für Beads mit Oligonukleotiden ist bisher in unseren Händen ein linearer oder exponentieller Amplifikationsschritt im Expressionsmonitoring erforderlich, wie dies auch bei vergleichbaren Arrays der Fall ist. Dazu wird über entsprechende Primer bei der reversen

Transkription ein T7-Promotor in die cDNA eingeführt, der die Transkription jeweils zahlreicher Kopien cRNA erlaubt. Abb 3 zeigt die Bindung einer FITC-dUTP markierten cRNA an verschiedene Microbeads. In Abb 4 ist die Konkurrenz doppelsträngiger Oligonukleotide mit einem Reporteroligonukleotid für das Mutationsscreening im RET-Protoonkogen gezeigt. Theoretisch können alle bekannten RET-Mutationen im Exon 10 und 11 mit insgesamt 38 Bead Populationen in einem Ansatz analysiert werden (5). Aus diesen Beispielen wird erkennbar, daß die Methode breit einsetzbar ist. Zu den molekularbiologischen Applikationen kommen noch Einsatzmöglichkeiten im Bereich von Immunoassays oder Enzymassays (6).

Ein wesentlicher Vorteil der Methode ist, daß die unterschiedlichen Beads vorab mit Oligonukleotiden beschichtet werden und Bead-Populationen nach Bedarf zusammengestellt bzw. modifiziert und ergänzt werden können. Im Gegensatz zu DNA-Arrays ist es auf diese Weise möglich, Art und Umfang der Analytik von Fall zu Fall zu bestimmen. Da die Technologie sich auch für Immunoassays eignet, ist die Gerätebasis auch für andere Zwecke nutzbar. Die Automatisierung des Verfahrens ist einfach, da auf bewährte Autoanalyzertechnologie zurückgegriffen werden kann.

**Abb 3**

Bindung einer IL-4 cRNA an Microbeads, die mit Oligonukleotiden für entweder TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 oder GAPDH beschichtet waren. Hierbei erfolgte eine direkte Hybridisierung der FITC markierten cRNA. Eine spezifische Bindung findet nur an die IL-4 beschichteten Mikrosphären statt.


**Abb 4**

Kompetition von doppelsträngigen Oligonukleotiden mit einem markierten 23 bp langen Reporteroligonukleotid komplementär zur Sequenz des RET-Protoonkogens mit dem Kodon 611 an Position 10-12, d.h. mittig, des Reporters. Zur Konkurrenz wurden Oligonukleotide mit der gleichen Sequenz bzw. mit dem Kodon 620, d.h. um insgesamt 27 bp gegenüber dem Reporter versetzt, an Position 10-12 eingesetzt.

#### Literatur

1. Graber JH, O'Donnell MJ, Smith CL, Cantor CR. Advances in DNA diagnostics. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9: 14-18
2. Ramsay G. DNA chips state-of-the-art. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 40-44
3. Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, Kettman JR jr. Advanced multiplexed analysis with the FlowMatrix system. *Clin Chem* 1997; 43: 1749-1756
4. Gordon RF, McDade RL. Multiplexed quantification of human IgG, IgA, and IgM with the FlowMatrix system. *Clin Chem* 1997; 43: 1799-1801
5. Eng C. The RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung's disease. *N Engl J Med* 1996; 335: 943-951
6. Oliver KG, Kettman JR, Fulton RJ. Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMatrix system. *Clin Chem* 1998; 44: 2057-2060

#### Korrespondenz

Prof. Dr. G. Schmitz  
 Institut für Klinische Chemie  
 und Laboratoriumsmedizin  
 Klinikum der Universität Regensburg  
 D-93042 Regensburg  
 Tel.: +49 941 944 6201  
 Fax: +49 941 944 6202