

Zusammenfassung

DNA Arrays können mit unterschiedlichen Methoden hergestellt werden. Vorgefertigte Oligonukleotide, die auf Arrays gekoppelt werden, können exakter synthetisiert und sorgfältiger analysiert werden, als direkt auf Arrays synthetisierte Oligonukleotide. Die DNA-Synthese ist eine ausgereifte Technik. Die Qualität der Produkte ist für DNA-Arrays ausreichend.

Schlüsselwörter

DNA-Chips, Array-Herstellung, Oligonukleotidsynthese

Summary

DNA Arrays can be synthesized *in situ* or be assembled from premade oligonucleotides. The synthesis on the chip is less exact and the products cannot be analyzed carefully. Assembly of sequences is more flexible in design. The final product is dependent on the quality of the single product. Oligonucleotides can be manufactured in high quality. If they are not made inhouse, they can be ordered from commercial suppliers.

Keywords

Oligonucleotide Synthesis, Array Technology, DNA-Chips

DNA-Arrays gewinnen zunehmend an Bedeutung. Neben der In-situ-Synthese auf einem Chip besteht die gängige Methode darin, vorgefertigte Oligonukleotide auf Arrays zu koppeln. Dieser Ansatz erlaubt eine schnellere Produktentwicklung, ist flexibler und führt zu Produkten mit reproduzierbar höherer Qualität, denn die In-situ-Synthese hat schlechtere Kopplungsraten und erlaubt keine Reinigung der Syntheseprodukte. Ein Array besteht aus bis zu einigen tausend Einzelsequenzen, die im Endprodukt selber nur schwer auf ihre Identität und Funktionalität getestet werden können. Defekte im Array können große Schäden verursachen. Daher ist es sinnvoll, hochwertige Komponenten zu verwenden, respektive diese vorab zu kontrollieren.

Obwohl die Synthese von Nukleinsäuren hoch entwickelt ist, erhält man bei Verwendung von kommerziell verfügbaren Syntheseautomaten und Reagenzien eine Vielzahl von Nebenprodukten. Einen Überblick über die Art der Nebenprodukte, die Ursachen ihrer Entstehung, die Vermeidung bzw. post-synthetische Abtrennung gibt Tabelle 1.

Angesichts der heutigen Reagenzienpreise ist die Verwendung von Sparprotokollen fragwürdig, da die Ausfallraten signifikant ansteigen und die Behebung von Fehlern sowie die Identifizierung und Absonderung fehlerhafter Produkte einen großen Aufwand verursachen. Der Schlüssel für die Herstellung hochwertiger Produkte liegt in der Verwendung hochwertiger

Tab 1 Überblick über die Art der Nebenprodukte, die Ursachen ihrer Entstehung, die Vermeidung bzw. postsynthetische Abtrennung

Nebenprodukt Fehlerhaftes Produkt	Ursache	Vermeidung/Verringerung	Abtrennung
N-1 Trityl Off Strangbrüche kürzerkettige Produkte	Unvollständige Kopplung Depurinierung	Optimierte Zyklen, hochwertige Reagenzien, optimale Synthesizer	HPLC, Trityl On-Aufreinigung Anionentauscher-Aufreinigung
N-1 Trityl On Deletionen kürzerkettige Produkte	unvollständiges Deblock uneffektives Capping, Oxidizing	Optimale Zyklen, optimale Synthesizer, hochwertige Reagenzien	PAGE Anionentauscher-Aufreinigung
N+1 Trityl On Insertionen, verzweigte Oligomere, unvollständig entschützte Produkte	Doppelkupplungen Schutzgruppenverlust schlechtes Trägermaterial	Optimierte Zyklen, hochwertige Chemikalien	PAGE Anionentauscher-Aufreinigung
Basenmodifikationen Falsche Basen (Kontamination)	Reagenzien Zustand der Synthesizer Temperatur Entschützung	Optimierte Zyklen, hochwertige Chemikalien	PAGE HPLC-Trityl Off- und/oder Anionentauscher-Aufreinigung
Unvollständige Entschützung	Reagenzien und Protokolle	Reagenzien und Protokolle	PAGE, HPLC Anionentauscher-Aufreinigung
Kontaminationen	HPLC-Säulen/Anlagen Lyophilisation	Konstruktion und Bedienung Instandhaltung	nicht möglich (Post-HPLC)
Vertauschungen	Organisation	Organisation / Tracking Identifikation (z.B. Masse)	nicht möglich (Identifikation)

Reagenzien, kontinuierlich gewarteter Produktionsanlagen und Prüfmittel und vor allem in der Prozessführung. Oligonukleotide werden hochgradig parallel hergestellt. Die Produkte werden in einem zyklischen Verfahren an einer festen Phase synthetisiert und dann chemisch abgespalten. Dabei werden je Kettenverlängerungsschritt vier chemische Reaktionen durchgeführt, so dass man leicht auf über 100 Reaktionsschritte kommt. Die gelösten Endprodukte werden über verschiedene chromatographische Verfahren aufgereinigt. Eine große Gefahr besteht daher trotz Automatisierung und Verwendung von Barcodes in der Vertauschung von Produkten, Kontaminationen oder ihrer Vermischung. Eine physikochemische Endkontrolle allein kann nicht unbedingt alle möglichen Fehler erkennen, selbst wenn sie mit aufwendigen Verfahren durchgeführt wird. Kontaminationen können, im Gegensatz zu verkürzten Produkten (n-1), weder in einer chromatographischen/CE-Analyse noch mittels einer Massenanalyse nachgewiesen werden. Vertauschungen können über die Masse festgestellt werden, wohingegen ein Molekül derselben Basenzusammensetzung ununterscheidbar bliebe. Die Endkontrolle ist daher nur im Zusammenhang mit einer kontrollierten Prozessführung sinnvoll, zum Beispiel durchgeführt im Rahmen eines Qualitätsmanagementsystems (QM) nach ISO 9001 oder einer Produktion nach den GMP-Richtlinien. Eine Funktionskontrolle zur Validierung jeder einzelnen Sequenz ist zu aufwendig.

Für die Herstellung von Arrays können die benötigten Oligonukleotide entweder im eigenen Hause gefertigt oder von einem darauf spezialisierten Lieferanten bezogen werden. Bei der Auswahl des Lieferanten muss die besondere Vertrauensstellung beachtet werden – schließlich liegt allein in der Sequenz der Schlüssel zum Produkt. Es empfiehlt sich, die tatsächliche Qualität von Oligonukleotiden verschiedener Lieferanten stichprobenartig zu überprüfen und nicht diese ausschließlich anhand von Preisangeboten auszuwählen. Ein besonderes Augenmerk muss man gerade auf die reaktive Gruppe richten, die zur Kopplung auf die feste Phase verwendet wird. Es gibt dort erhebliche Unterschiede in der tatsächlichen Funktionalität. Bei der Auswahl des Lieferanten sollte auch ein Audit beim Hersteller nicht ausgeschlossen werden. Typische QM-Merkmale, wie zum Beispiel die Verfügbarkeit von Rückstellmustern, sollten selbstverständlich sein. Bei einer langfristigen Zusammenarbeit können individuelle Qualitätskriterien vereinbart werden.

Korrespondenzadresse
Olfert Landt
TIB MOLBIOL
Tempelhofer Weg 11-12
10829 Berlin
Tel 0049-030-7879 940
Fax 0049-030-7879 9499
Olandt@TIB-MOLBIOL.de