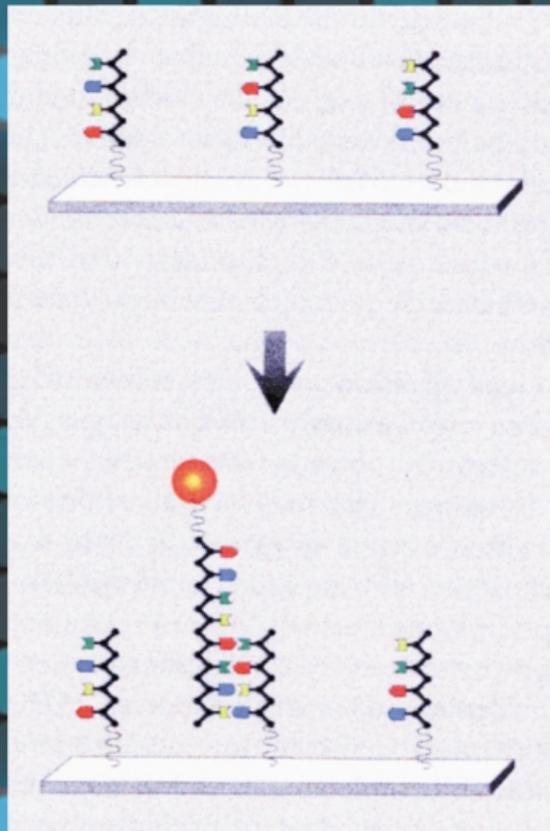


Die Begriffe DNA-Chips oder DNA-Mikroarray bezeichnen die systematische Anordnung von biomolekularen Sonden, z.B. DNA-Moleküle, auf festen Oberflächen aus Glas, Metallen oder Kunststoffen.



Zum Nachweis eines bestimmten Moleküls nutzt man charakteristische molekulare Interaktionen, wie die sequenzspezifische Hybridisierung von Nucleinsäuren. Nach der erfolgten Hybridisierung von Fluorophor-markierten cRNA- oder cDNA-Proben kann dann das erhaltene Hybridisierungsmuster mit einem Fluoreszenz-Scanner abgelesen werden.

Der mittlere Teil der Illustration stammt von C. M. Niemeyer und D. Blohm aus der im Beitrag zitierten Lit. [5].

Die Herstellung von DNA-Chips

Michael C. Pirrung*

Die Entwicklung von Mikroarrays gehört derzeit zu den aktuellsten Gebieten der biologischen Forschung. Sie werden meistens für die Analyse von Nucleinsäuren eingesetzt, insbesondere um zu beurteilen, welche Gene in welcher Menge exprimiert werden. Da die ersten Mikroarrays durch photolithographische Verfahren hergestellt wurden, die sonst zur Fertigung integrierter Schaltkreise („Computerchips“) genutzt werden, findet man häufig auch den Begriff „DNA-Chip“. Die Entschlüsselung der Genomsequenzen von Menschen und vielen anderen Organismen erfordert als nächsten wichtigen Schritt, um die Rolle der DNA bei den Vorgängen des Lebens zu verstehen, die Erforschung der Wirkungsweise von Genen. Hierfür sind DNA-Mikroarrays ein

ausgezeichnetes Hilfsmittel, denn ihre zahlreichen Sondenorte ermöglichen es, viele Gene gleichzeitig zu analysieren. Aufgrund der guten Erfahrungen mit dieser ersten Verwendung werden weitere Anwendungen für Mikroarrays entwickelt, darunter die Genotypisierung in der Forschung und die genetische Diagnose in der Medizin. Die DNA-Mikroarrays haben das Leistungsvermögen der Parallelität in der biologischen Analyse eindeutig belegt, sodass das Interesse an anderen Mikroarrays (kleine Moleküle, Proteine) wächst. Zahlreiche Anwendungen für DNA-Mikroarrays wurden bereits entwickelt, und durch die Kreativität der Wissenschaftler, die sie nutzen, werden es zweifellos noch viel mehr werden. Für die ersten Untersuchungen stellten die Anwender

ihre Mikroarrays selbst her. Das offensichtliche Leistungsvermögen von Mikroarrays erforderte aber verbesserte Herstellungsmethoden, und nun werden Methoden aus der Physik und dem Ingenieurwesen auf DNA-Chips angewandt. Für die Entwicklung weiterer, verbesserter Methoden können viele Gebiete der Chemie beitragen: von der Synthesechemie, die zur Anknüpfung oder Herstellung von DNA eingesetzt wird, über die physikalische Chemie von Oberflächen bis zur analytischen Chemie, um Reaktionen an Oberflächen zu beurteilen.

Stichwörter: Analytische Methoden • Kombinatorische Chemie • Mikroarrays • Nucleotide • Oberflächenanalyse

1. Einleitung

Als Mikroarrays werden hier monolithische, flache Träger mit zahlreichen – oft Hunderten oder Tausenden – Testorten bezeichnet, von denen jeder ein Reagens enthält, welches bei der molekularen Erkennung eines komplementären Moleküls ein Signal liefern kann, das durch ein Abbildungsverfahren, meistens mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierungen, nachzuweisen ist. In der Literatur vor 1995 bezeichnet der Begriff Mikroarray eher Anordnungen aus Elektroden als Anordnungen aus verschiedenen Verbindungen. Der erste, 1991 beschriebene molekulare Mikroarray bestand aus Peptiden und nicht aus DNA und wurde auch nicht als Mikroarray erkannt.^[1] Das photolithographische Verfahren, mit dem diese Anordnung hergestellt wurde, ist in einer früheren

Übersicht umfassend behandelt worden.^[2] Inzwischen sind über DNA-Mikroarrays drei Bücher^[3] und mehrere Übersichtsartikel erschienen^[4,5] sowie eine populärwissenschaftliche Beschreibung.^[6]

DNA-Arrays sind ein so aktuelles Thema, weil sie einen schnelleren, einfacheren und billigeren Zugang zu Informationen über Nucleinsäuregehalt und -sequenzen versprechen als herkömmliche Methoden. Erkennungselemente für Nucleinsäuren sind rasch zu synthetisieren und können oft wiederverwendet werden. Als Hauptanwendungen für DNA-Arrays sind die großtechnische Genotypisierung und die Profilierung der Genexpression geplant. Die Fähigkeit von DNA-Arrays zur Parallelbearbeitung begünstigt in der Tat einen neuen, aus der Genomsequenzierung hervorgegangenen Zugang zur Wissenschaft: die systematische Untersuchung im Unterschied zum Experimentieren aufgrund einer Hypothese.

Die beiden Schlüsselgrößen eines Mikroarrays (Abbildung 1) sind die Zahl der unterschiedlichen Sondenorte (Spots) pro Flächeneinheit, die die Informationsdichte (auch

[*] Prof. M. C. Pirrung

Department of Chemistry, Levine Science Research Center
Box 90317, Duke University, Durham, NC 27708-0317 (USA)
Fax: (+1) 919-660-1591
E-mail: pirrung@chem.duke.edu

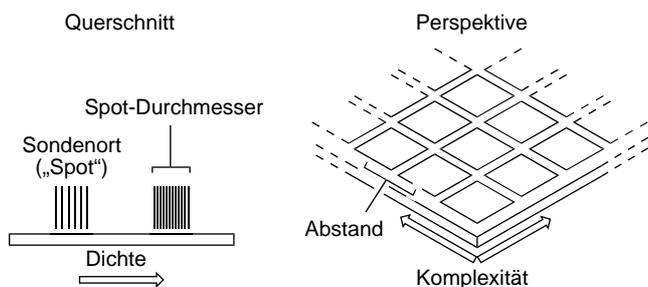


Abbildung 1. Charakteristische Schlüsselgrößen von Mikroarrays.

Komplexität genannt) widerspiegelt, und die Zahl der Testmoleküle pro Flächeneinheit in einem einzelnen Sondenort (Dichte, die Begriffe Dichte und Komplexität werden in der Literatur nicht immer einheitlich verwendet). Je mehr Sonden man pro Array hat, umso mehr Informationen erhält man und

umso wirksamer ist das bioanalytische Hilfsmittel. Um die Größe des Arrays zu minimieren, sollten die Sondenorte und ihr Abstand (Pitch) so klein wie möglich sein, wobei die molekulare Erkennung dennoch zuverlässig nachgewiesen werden muss. Kleine Arrays verringern die zur Analyse benötigte Menge der biologischen Probe. In Tabelle 1 sind diese Eigenschaften für ausgewählte Verfahren der Chip-Herstellung zusammengefasst. Ähnlich wie der Beladungsgrad von Trägern in der Festphasensynthese regelt in einem gegebenen Spot die Zahl der Sondenmoleküle die intermolekularen Wechselwirkungen. Ein enger Sondenabstand ermöglicht komplexe Wechselwirkungen zwischen vielen Sonden und der zu analysierenden Nucleinsäure, sodass nichtklassische Bindungen entstehen, die manchmal vorteilhaft sein können.^[7] In anderen Fällen wurde eine zum großen Teil normale Langmuir-Bindungsisotherme beschrieben.^[8]

Tabelle 1. Ausgewählte Parameter von DNA-Chips.

Wissenschaftler	Institution	Dichte (Moleküle cm ⁻²)	Träger und Verknüpfung	Typischer Durchmesser
Schena ^[41]	Univ. Stanford	NR	Glas-Polylysin an PCR-Produkt	2479 × 345 µm
Belosludtsev ^[31]	Genometrix	3 × 10 ¹³	Glas-Silan-Amin an nativer DNA	7 × ? µm
Beattie ^[20]	HARC	1.0 × 10 ¹²	Si-Glas-Silanepoxid an Amino-DNA	NR
Wöhrle ^[33]	Univ. Bremen	9.0 × 10 ¹²	Glas-Silanamin-PDI-PAMAM-PDI an 5'-Amino-DNA	128 × 140 µm
Zammatteo ^[45]	Univ. Notre-Dame de la Paix	3.6 × 10 ¹¹	Glas-Silanaldehyde an 5'-Amino-DNA	9 × 0.4 mm
Boyce-Jacino ^[27]	Orchid	3 × 10 ¹³	Glas-Silanthiol an Disulfid-DNA	49 × 1 mm
Steel ^[36]	Gene Logic	6 × 10 ¹²	Mikrokanäle aus Glas-Silanthiol an Maleinimid-3'-Amino-DNA	256 × 200 µm
Mirzabekov ^[34]	Argonne	1.8 × 10 ¹⁵	Glas-Polyacrylylhydrazid an 3'-Dialdehyd-DNA	64 × 100 µm
Smith/Hamer ^[26]	Univ. Wisconsin	5.3 × 10 ¹²	Si-Undecanoat-Polylysin-Maleinimid an 5'-Thiol-DNA	2 × 2 mm
Hogan ^[21]	Baylor Univ.	1 × 10 ¹²	Si-Silanepoxid an 5'-Amino-DNA	16 × ? µm
Téoule ^[39]	CIS Bio	1 × 10 ¹²	Pt an 5'-(Poly)pyrrol-DNA	4 × 0.62 mm
Heller ^[40]	Nanogen	1.6 × 10 ¹²	Pt-Agarose-Streptavidin an 5'-Biotin-DNA	10000 × 30 µm
Smith/Corn ^[19b]	Univ. Wisconsin	5 × 10 ¹²	Au-Thiol-Säure-Polylysin-Maleinimid an Thiol-DNA	8 × 3 mm
Corn ^[24]	Univ. Wisconsin	NR	Au-Thiol/Amin-Maleinimid an Thiol-DNA	9 × 750 µm
Corn ^[25]	Univ. Wisconsin	1.5 × 10 ¹²	Au-Thiol/Amin-Disulfid an Thiol-DNA	16 × 500 µm
Yamamoto ^[37]	Canon	NR	Quarz-Silan-Amin-Maleinimid an 5'-Thiol-DNA	64 × 70 µm
Pirrung ^[28]	Duke Univ.	NR	Glas-Silan-Bromacetamid an 5'-Phosphorothioat-DNA	64 × 100 µm
Zhao ^[29]	Amersham	NR	Glas-Silan-Bromacetamid an DNA mit Phosphorothioat	100 × 150 µm
Southern ^[72]	Univ. Oxford	4 × 10 ¹³ (ber.)	In-situ-DMTr-Synthese an Glas-HEG-Linker	191 × 2.5 mm
Theriault ^[68]	Combion	1.2 × 10 ⁷	In-situ-DMTr-Synthese	10000 × 0.1 mm
Brennan ^[67]	Protogene	1.3 × 10 ¹²	In-situ-DMTr-Synthese an Glas-HEG-Linker	? × 50 µm
Blanchard ^[69]	Rosetta	NR	In-situ-DMTr-Synthese an Glas-HEG-Linker	25000 × 100 µm
Trulson ^[7]	Affymetrix	1 × 10 ¹²	photochemische In-situ-Synthese an SiO ₂ -HEG-Linker	135000 × 35 µm
McGall ^[60]	Affymetrix	NR	In-situ-DMTr-Synthese mit polymerem Photolackfilm an SiO ₂ -HEG-Linker	256 × 100 µm
Matson ^[71]	Beckman	1.2 × 10 ¹⁰	In-situ-Synthese an Polypropylen-5'-Phosphoramidat-Linker	64 × 0.5 mm

NR = nicht angegeben, HEG = Hexaethylglycol.



Michael Pirrung begann seine Ausbildung als Chemiker an der University of Texas at Austin. Er promovierte unter der Anleitung von Clayton Heathcock an der University of California at Berkeley, wo seine Forschungsarbeiten das Interesse an der photochemischen Synthese weckten. Nach einem einjährigen Aufenthalt bei Gilbert Stork an der Columbia University, NY, ging er nach Stanford. Ab 1988 gehörte er zu einer von Alejandro Zaffaroni geleiteten Gruppe von Wissenschaftlern, die in Palo Alto die neue Firma Affymax gründeten. Seine Arbeit dort konzentrierte sich auf die lichtgesteuerte Synthese, die 1991 zum ersten Mikroarray führte. Pirrung ist jetzt Professor für Chemie an der Duke University. Seine Forschungsinteressen liegen im Bereich der chemischen Biologie mit einem besonderen Schwerpunkt auf Mikroarray-Technologien und kombinatorischer Chemie.

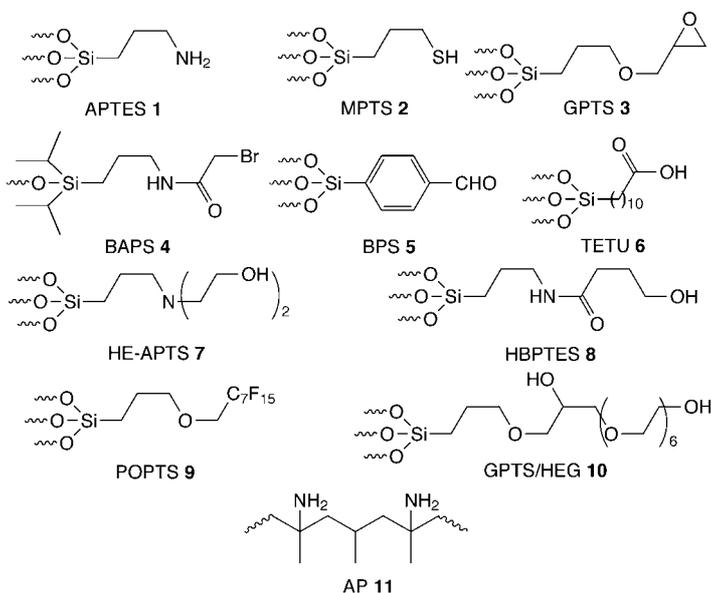
Obwohl für das Anknüpfen von DNA an flache Träger viele Reaktionen bekannt sind, werden nicht alle davon verwendet, um Multielement-Mikroarrays zu erzeugen. Es erscheint zwar naheliegend, dass mit einer Reaktion nicht nur ein Oligonucleotid hergestellt oder verknüpft werden kann, sondern prinzipiell viele, da aber in der Praxis die Bildung von Mikroarrays hoher Komplexität Wiederholungsschritte erfordert, akkumulieren kleine Fehler in einzelnen Stufen zum Chaos. Dass die Effizienz einer mehrstufigen Sequenz das Produkt der Ausbeuten der Einzelschritte ist, weiß jeder Chemiker. Prägetechniken, mit denen sich gemusterte Oberflächen ausgezeichnet herstellen lassen, sind manchmal ungeeignet, um zehn oder mehr Reagentien oder Tausende von DNA-Sonden abzugeben.

Viele Aspekte der Mikroarray-Herstellung treten bei allen der sehr unterschiedlichen Methoden auf. Ein Aspekt ist der Linker, der genutzt wird, um einen Abstand zwischen der Oberfläche und dem zur Hybridisierung genutzten Oligonucleotidabschnitt zu schaffen. Mit diesem werden sterische Kollisionen mit hinzukommenden Molekülen vermieden und der ganze Vorgang verläuft etwas mehr wie in einer Lösung. Als Linker wurden Ethylenglycololigomere oder einfach eine Sequenz aus Thymin(T)-Basen verwendet. Für die Herstellung und Derivatisierung der Träger gibt es zahlreiche Methoden. Aber – wie so häufig – wenn es für ein Problem viele Lösungen gibt, ist oft keine wirklich gut. Allerdings ist es auch schwierig für die auf dem sich erst entwickelnden Gebiet der DNA-Chips arbeitenden Wissenschaftler, die gesamte gegenwärtige Forschung und die Bedeutung spezieller Technologien zu kennen.

Die Auswahl des Oberflächenmaterials für einen Mikroarray und ihre Vorbehandlung haben erhebliche Anstrengungen erfordert. Wegen der leichten Verfügbarkeit ist der Standardobjektträger aus Glas, es gibt aber auch kompliziertere Oberflächen wie Quarz-, Gold- und Siliciumwafer. Die Träger werden im Allgemeinen gereinigt, z. B. mit Detergentien, starken Oxidationsmitteln ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ oder „Piranhalösung“, Sauerstoffplasma, $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$), Ultraschall, Säure oder Base. Der Zweck (und auch der Erfolg!) der Reinigung ist nicht immer klar, auch wenn man darin übereinstimmt, dass die Entfernung jeglicher organischer Oberflächenverunreinigung, die die nachfolgende Silanbeschichtung stören könnte, von Vorteil ist.

Bei Trägern aus Siliciumoxid muss der Chip mit einem Organosilan beschichtet werden, das eine funktionelle Gruppe enthält, die mit einer Gruppe am Oligonucleotid oder an einem zur Synthese von Oligonucleotiden geeigneten Linker reagieren kann. Demzufolge hängt das Wissen über Siliciumbeschichtungen und das über DNA-Chips eng zusammen. Nach allgemeiner Ansicht ist die Bildung dünner Siloxanfilme an Siliciumoxiden mit der Hydrolyse von Alkoxysilanen zu einem polymeren Netzwerk verbunden, das im Beschichtungsschritt physikalisch an die Silanolhydroxygruppen adsorbiert wird. Die Bildung eines stabilen chemisch adsorbierbaren Films erfolgt beim anschließenden Glühen.^[9] Die einheitliche Derivatisierung des Trägers mit einem Organosilan hat wahrscheinlich vielen Anfängern auf dem Gebiet der DNA-Chips erhebliche Schwierigkeiten bereitet. Als makroskopischer Vorgang ist die Beschichtung nicht ohne weiteres

zu verfolgen, auch wenn sie im Allgemeinen zu einer signifikant höheren Hydrophobie führt, die durch das Abperlen von Wasser von der Oberfläche beobachtet und über den Benetzungswinkel analysiert werden kann. Derartige Oberflächen werden häufig als Monoschichten bezeichnet, allerdings nicht weil es direkte Hinweise darauf gibt, sondern eher weil das idealisierte Schema für die Siloxanbindung keine Mehrschichten zulässt. Nur wenig Beachtung fand die Erkenntnis, dass auf Siliciumoxidwafer mit APTES (**1**, Aminopropyltriethoxysilan, Schema 1), einem gebräuchlichen Derivatisierungsmittel für DNA-Chips, unter sehr milden Bedingungen (Toluol, RT, 15 min) eine echte Monoschicht aufgebracht werden kann.^[10] Viele Forscher nutzten für die Beschichtung drastischere Bedingungen, die zweifellos Mehrschichten liefern. Die Verwendung chemometrischer Hilfsmittel zur Optimierung der Beschichtung von Glasträgern mit 3-Sulfanylpropyltrimethoxysilan (MPTS, **2**) ergab, dass sich nur die Beschichtungsdauer und die Glühstufe signifikant auf die endgültige Thiolbeladung auswirken.^[11]



Schema 1. Reagentien zur Derivatisierung von Trägern.

Die Planung der Sondensequenzen, die auf einem Mikroarray platziert werden, scheint einfach zu sein – sie müssen komplementär zum Analyten sein. Allerdings kann es notwendig sein, die Schmelztemperatur von kurzen Sonden mit unterschiedlichen G/C-Anteilen durch Ändern ihrer Längen anzugleichen. Die Sonden sollten zudem eine innere Mindeststruktur haben und im Analyten Orte mit innerer Mindeststruktur ansprechen. Diese Probleme sollten durch Berechnung leicht zu lösen sein, auch wenn die rechnerische Vorhersage der Sekundärstruktur einer RNA schwierig ist. Dafür kann eine empirische Heuristik auf der Basis der Hybridisierung an Sondenarrays verwendet werden,^[12] es sind aber auch andere Richtlinien entwickelt worden.^[13]

2. Das Auftragen von zuvor synthetisierten Oligonucleotiden

Mikroarrays aus zuvor synthetisierten Oligonucleotiden sind sehr verbreitet. Zu ihrer Herstellung gehören folgende Schritte: Derivatisierung der Träger mit funktionellen Gruppen, Derivatisierung der Nucleinsäure mit komplementären funktionellen Gruppen, Abgabe kleinster Volumina der Spotting-Lösung und Desaktivierung der nicht umgesetzten, Oberflächen-gebundenen funktionellen Gruppen. Ein Qualitätsproblem ist dabei die Verteilung des Oligonucleotids in jedem Spot. Gewöhnlich beobachtet man die Bildung von Spots, deren Oligonucleotiddichte an den Rändern größer ist als in der Mitte. Das selbe Phänomen tritt auf, wenn man Kaffee verschüttet und sich ein kranzförmiger Fleck bildet. Dafür gibt es eine recht einfache Erklärung: Die Lösung fließt an den Fleckrand und verdunstet dabei.^[14] Dies ist eine mögliche Ursache für anisotrope Spots, aber auch Kontaktdruckverfahren können die Oberfläche schädigen. Um eine derartige Morphologie zu vermeiden, müssen bei den Spotting-Methoden die Benetzungseigenschaften des Lösungsmittels verändert, ein Verdunsten vermieden und/oder die Schädigung der Oberfläche begrenzt werden.

Viele Neulinge auf diesem Gebiet machten wahrscheinlich so wie auch unser Arbeitskreis folgende, zunächst abschreckende Erfahrung: Man trägt ein funktionalisiertes Oligonucleotid auf eine derivatisierte Oberfläche auf und detektiert einen schönen leuchtenden Fleck, um dann verärgert festzustellen, dass ein Kontrolloligonucleotid ohne die funktionelle Gruppe entweder beim Anknüpfen einer Markierung oder bei der anschließenden Hybridisierung ebenfalls einen leuchtenden Fleck bildet. Es ist nicht überraschend, dass native DNA fest an Glasoberflächen haften kann; auf dieser Eigenschaft beruhen viele Kits zur Reinigung von Plasmid-DNA aus Kleinstaufbereitungen. Tatsächlich soll die Derivatisierung des Oligonucleotids und der Glasoberfläche für Assays auch unter ziemlich strengen Bedingungen unnötig sein.^[15]

Die Geräte, die Oligonucleotide auf Arrays aufbringen, waren anfangs selbstgebaut, sind nun aber kommerziell erhältlich. Das erste derartige System wurde in Stanford entwickelt (siehe Abschnitt 2.2). Die Methoden und Geräte, die zur Abgabe winziger Volumina der Oligonucleotidlösung eingesetzt werden können, wurden von Rose eingehend beschrieben.^[16] Die Bildung der Spots erfolgt entweder durch Berühren der Oberfläche mit einem Stift oder einer Nadel oder durch ein unter Druck aus einer Düse hervortretendes Flüssigkeitströpfchen. Dabei werden Flüssigkeitsvolumina zwischen 50 pL und 100 nL abgegeben, und die entstehenden Spots haben eine Größe von 75–500 μm . Da diese beiden entscheidenden Größen bei Kontakt- und Nichtkontaktmethoden kaum differieren, muss die Wahl der Spotting-Technik auf anderen Überlegungen beruhen. Die „Nadeln“ zur Abgabe von pL-Volumina sind raffiniert konstruiert (Abbildung 2). Viele sind im Wesentlichen wie sehr stark verkleinerte Füllfederhalterspitzen aus Edelstahl mit einem Spalt, der die Oligonucleotidlösung durch Kapillarwirkung aufzieht. Diese Nadeln sind in diversen Größen erhältlich^[17] und liefern Spots in vielen Größen und Dichten. Sie können bis zu ca.



Abbildung 2. Ausführungen von Nadeln und Stiften zur Abgabe von pL-Volumina.

1 μL Lösung aufnehmen, sodass mit einer Beladung Mehrfachabgaben möglich sind. Durch „Vordrücken“ mehrerer Spots, die verworfen werden, kann überschüssige Lösung entfernt und gleichmäßig aufgetragen werden. Andere Nadeln sind dagegen massiv, die Lösung haftet an ihren Seiten (flach oder konkav), und sie setzen ihre ganze Beladung in einem Spot ab. Bei einer Variante dieses Prinzips wird die Lösung in einen Metallring geladen, durch den eine massive Nadel gestoßen wird, um erst das Oligonucleotid aufzunehmen und danach abzugeben, sodass mit einer Beladung Mehrfachabgaben möglich sind.^[18] Die genannten Nadelarten hinterlassen beim Berühren der Oberfläche einen Spot von ca. 1 nL, dessen Durchmesser von den Oberflächenenergien der Nadel, der Flüssigkeit und des Trägers bestimmt wird. Ein generelles Problem beim Nutzen von Abgabesystemen mit mehreren Oligonucleotiden ist das Mitschleppen, wenn nach dem Spotting des ersten Oligonucleotids und der Rückkehr zur Ausgangsplatte das zweite aufgenommen wird. Daher sind zwischen verschiedenen Proben Reinigungsschritte erforderlich. Mehrere Nadeln oder Düsen — die bisher höchste Zahl war 64 — in einem Druckkopf beschleunigen die Herstellung von Arrays. Automatisierte Spotting-Systeme haben fixierte Plätze für die Träger und Mikrotiterplatten mit den Oligonucleotiden als „Ausgangsplatten“. Beide können vom Druckkopf über eine mehrachsige Positionierungsbühne erreicht werden. Die Hydrophobie des Silanfilms sorgt dafür, dass der Spot nach der Abgabe durch die Oberflächenspannung seine Größe beibehält und sich nicht ausbreitet, wie er es auf einer hydrophilen Oberfläche täte. Während der Abgabe muss die Sauberkeit der Umgebung besonders kontrolliert und nach dem Spotting das Verdampfen eingeschränkt werden (relative Feuchtigkeit > 70%), damit genügend Zeit zum Verknüpfen des Oligonucleotids bleibt, was bei manchen Methoden mehrere Stunden dauern kann. Eine hohe Feuchtigkeit kann zudem die Homogenität der Spots verbessern.

2.1. Synthetische Oligonucleotide

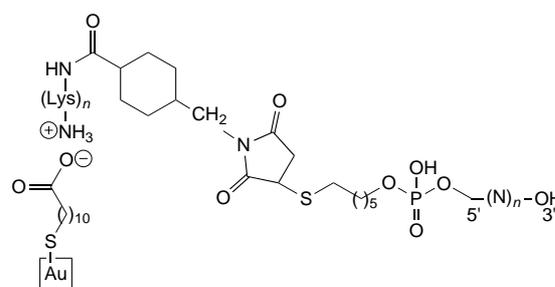
Um synthetische Oligonucleotide zu immobilisieren, werden während der konventionellen automatisierten Synthese chemische Funktionen eingeführt, die mit komplementären funktionellen Gruppen an der Oberfläche reagieren können. Verknüpfungseinheiten können generell am 3'-Ende (Synthesebeginn), an inneren Positionen oder am 5'-Ende (Syntheseende) eingefügt werden. Für Hybridisierungsassays dürfte die Verknüfungsposition unerheblich sein. Andere Assays, bei denen enzymatische Umwandlungen (mit Polymerasen oder Ligasen)^[19] am trägergebundenen Oligonucleo-

tid stattfinden müssen, erfordern ein freies 3'-Ende, sodass die Verknüpfung intern oder am 5'-Ende erfolgen muss.

2.1.1. Aufbringen der Sonden (Spotting)

Die ersten Arbeiten über diese Methode stammen von der Baylor University und dem Houston Advanced Research Center (HARC). Glasträger^[20] oder SiO₂-beschichtete Siliciumwafer^[21] wurden mit Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GPTS, **3**, Schema 1) behandelt, um Epoxidgruppen einzuführen. Danach wurden synthetische Oligonucleotide (3'- und 5'-Aminopropyl-9mere und -36mere, **21** und **22**, Schema 6) in 0.1M KOH aufgetragen (5 μ L). Im alkalischen Bereich liegt das Amin als freie Base vor und die Epoxidöffnung ist erleichtert, sie ist aber dennoch verhältnismäßig langsam und ineffizient (ca. 1%). Durch eine höhere Zahl von Triethylglycolphosphat-Spacern zwischen der DNA und der Trägeranknüpfung nimmt zwar die anschließende Hybridisierung mit langen DNA-Molekülen zu, sie wirkt sich aber auf kürzere Zielverbindungen nicht aus.

DNA-Arrays auf Glas wurden auch in der Arbeitsgruppe von Corn an der University of Wisconsin hergestellt.^[22] Durch Behandeln von APTES-Trägern mit 1,4-Phenylendiisocyanat (PDI, **12**, Schema 2) können 5'-Aminooligonucleotide mit

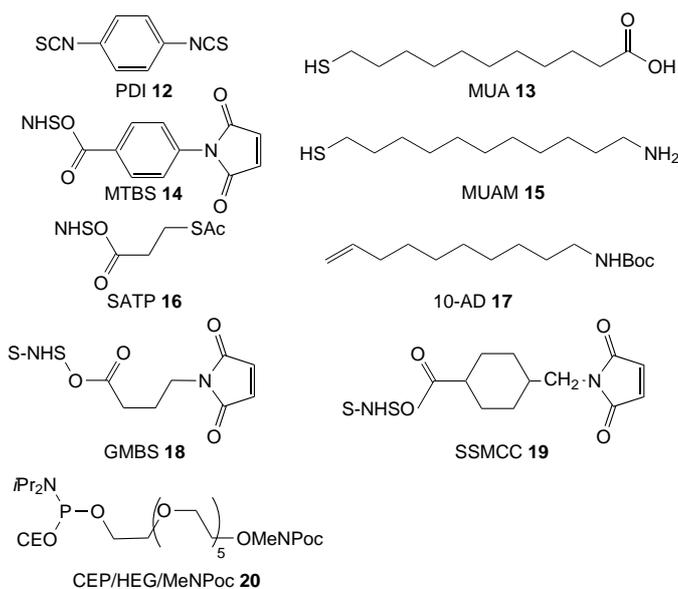


Schema 3. DNA-Array mit einer Thiol/Gold-Mehrschicht.

das Auftragen von 0.8- μ L-Tropfen entstehen Spots von 3 mm. Das Goldsubstrat ermöglicht die Analyse durch Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance, SPR), wodurch jeder Herstellungsschritt (durch Messungen der Filmstärke) ebenso wie Bindungsereignisse direkt verfolgt werden können. SPR-Abbildungen^[8] bieten eine Alternative zur konfokalen Fluoreszenzmikroskopie, dem bisherigen „Arbeitspferd“ auf dem Gebiet des Arrays.

Die Arbeitsgruppe von Corn hat eine ähnliche Methode zur Herstellung eines prägemusterten Arrays entwickelt, bei dem die Sondengröße nicht durch Spreitung begrenzt ist.^[24] Die erste Schicht aus 11-Sulfanylundecylamin (MUAM, **15**) wurde mit Fmoc-Gruppen geschützt. Durch anschließende Photolithographie wurden die Thiole oxidativ aus den belichteten Goldflächen entfernt, sodass Arrayelemente entstanden (750- μ m-Durchmesser), die erneut mit MUAM behandelt wurden, wobei Bereiche mit einer Aminoberfläche umgeben von hydrophoben Fmoc-Aminen (nicht benetzbare Regionen) gebildet wurden. Diese Arrayelemente wurden mit SSMCC (**19**, Abgabe von 0.1 μ L durch Mikropipette) und danach mit einem Oligonucleotid-5'-thiol derivatisiert. Die Fmoc-Gruppen wurden abgespalten und die freien Amine mit einem Polyethylenglycol-NHS-Ester umgesetzt, um diese nicht benetzbaren Regionen adsorptionsresistent zu machen. Dieses Verfahren (Schema 4) ist komplizierter als die direkte Modifizierung von Goldoberflächen mit thiolierten DNA-Sequenzen, verringert aber unspezifische DNA-Anknüpfungen und ermöglicht es, die Dichte trägergebundener DNA durch Verdünnen mit einfachen Thiolen zu variieren. Eine Erweiterung dieser Methode ist die Bildung von Disulfidoberflächen, um die Thiol-derivatisierte DNA **23** (Schema 6) zu binden.^[25] Die gemusterten MUA-Oberflächen werden mit SATP (**16**) umgesetzt, das danach zum Thiol desacetyliert wird. Dieses wird mit (PyrS)₂ in ein Disulfid überführt, welches mit 5'-Thiol-DNA reagiert. Alle genannten Oberflächen wurden durch IR-Spektroskopie und SPR umfassend charakterisiert.

Auch die Modifizierung von Siliciumoberflächen zur DNA-Verknüpfung wurde an der University of Wisconsin untersucht (Schema 5).^[26] Silicium mit endständigen Wasserstoffatomen wird durch Behandeln oxidierter Siliciumwafer mit HF hergestellt. Die Si-H-Bindung addiert photochemisch an Alkene, sodass eine Si-C-Bindung entsteht. Die Anwendung dieser Methode auf Boc-geschütztes 10-Amino-1-decen (10-AD, **17**) liefert eine Boc-Amin-Oberfläche. Diese kann nach dem Deblockieren wie beschrieben mit SSMCC gekuppelt

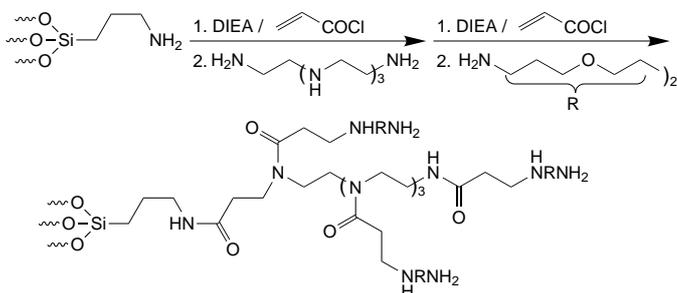


Schema 2. Reagentien für die DNA-Anknüpfung. S-NHS = Sulfo-succinimidyl, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, MeNPoc = ((α -Methyl-2-nitropiperonyl)oxy)carbonyl.

einem T₁₀-Spacer immobilisiert werden. Etwa 20% der aufgetragenen Oligonucleotide stehen für eine Hybridisierung zur Verfügung. Mit den selbstorganisierten Monoschichten (self-assembled monolayers, SAMs) aus Thiolen an Gold wurde eine verfeinerte Verknüpfungsschemie entwickelt. Ausgehend von 11-Sulfanylundecansäure (MUA, **13**) wurde eine Mehrschichtstruktur geschaffen, die Polylysin elektrostatisch adsorbiert (Schema 3).^[23] Diese Oberfläche wird mit dem Vernetzungsmittel SSMCC (**19**) derivatisiert, sodass sie mit 5'-Thiol-modifizierten Oligonucleotiden reagieren kann. Durch

tät zur Ziel-DNA sind wesentliche Eigenschaften von Mikroarray-Methoden, die auf aminierten Oberflächen basieren.

Eine zunehmende Oligonucleotiddichte in den Sondenorten sollte die Signale und damit die Empfindlichkeit erhöhen. Zu diesem Zweck wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg ein vielseitiger dendrimere Linker für die Verknüpfung von Oligonucleotiden entwickelt.^[32] Dazu wurden aminierte Glas- oder Polypropylen-träger in einer vierstufigen divergenten Dendrimersynthese umgesetzt (Schema 7), wodurch sich die ursprüngliche Aminbeladung auf das Fünffache erhöhte. Nach der Aktivierung der Amine mit der Diisothiocyanatmethode wurden Sonden oder PCR-Produkte (siehe Abschnitt 3.2) mit 5'-Aminosubstituenten immobilisiert, wobei Volumina von 1–50 nL Spots in der Größe von 0.2–0.8 mm lieferten. Die verbliebenen Isothiocyanatgruppen wurden mit 6-Aminohexanol desaktiviert.



Schema 7. In-situ-Synthese eines Dendrimer-Linkers. DIEA = Diisopropylethylamin.

Alternativ dazu kann ein zuvor synthetisiertes Dendrimer an den Träger geknüpft werden.^[33] Wissenschaftler der Universität Bremen banden an einen Isothiocyanat-aktivierten, aminierten Glasträger Starburst-Polyamidoamin (PAMAM)-Dendrimere, deren Aminogruppen sie anschließend mit PDI (**12**) aktivierten, um ein Oligonucleotid (in Konzentrationen ≤ 1 nL) zu binden. Verglichen mit konventionellem Aminosilanglas war das Hybridisierungssignal dieser Arrays doppelt so stark, einheitlicher und reproduzierbar.

Die Dichte der Testorte auf einem funktionalisierten Träger sollte direkt proportional zur Trägeroberfläche sein. Ein flacher, nicht poröser Glas- oder Siliciumträger muss eine Oberfläche nahe an der makroskopischen Oberfläche des Objekts haben. Durch Bildung einer dreidimensionalen Struktur am Träger sollte die Oberfläche und damit die Oligonucleotiddichte zunehmen. Dieses Ziel ist auf zwei Wegen zu erreichen.

Am Argonne National Laboratory nutzte man die in der Molekularbiologie häufig verwendeten Gel-bildenden Verfahren, um Acrylamid/Bisacrylamid photolithographisch in zuvor festgelegte 10–100 μm kleine quadratische Flächen zu polymerisieren (Abbildung 3).^[34] Die so erhaltenen 5–20 μm dicken Polyacrylamid-Pads haben Volumina im pL- bis nL-Bereich und sind durch 20–200 μm breite hydrophobe Regionen getrennt. Durch Transamidierung mit Diaminen erhalten die Gelpads Aminpositionen für die Immobilisierung. Da die Porosität des Gels durch eine Quervernetzung von 4% eingeschränkt ist, gilt für die zu immobilisierende

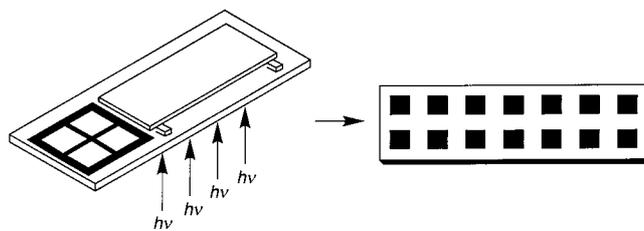


Abbildung 3. Herstellung eines Gelpad-Arrays.

DNA eine Grenze von 150–200 nt. In diese DNA werden Aldehydgruppen durch Umsetzung mit **27** eingeführt, dessen 3-Methyluridingruppe am 3'-Ende mit Periodsäure gespalten werden kann. Lösungen der funktionalisierten Oligonucleotide können mit einer Nadel oder einer piezoelektrischen Kapillardüse auf die Gelpad-Arrays abgesetzt werden.^[35] Der Dialdehyd wird durch reduktive Aminierung ($\text{Pyr} \cdot \text{BH}_3$) irreversibel an das Gel gebunden.

Bei Gene Logic wurden dreidimensionale „Durchfluss“-Chips entwickelt, deren Oberfläche theoretisch etwa hundertmal größer ist als die planarer Träger.^[36] Als Ausgangsmaterial dienen kommerzielle Array-Glasplatten (48 \times 48 mm^2) mit 10 μm großen hexagonal angeordneten Mikrokanälen. Diese Kanäle füllen sich durch Kapillarkwirkung zwar rasch mit Flüssigkeit, der Austausch mit außen befindlichen Lösungen verläuft aber sehr langsam. Daher wendet man Druck oder Ultraschall an, um Flüssigkeiten in die Mikrokanäle zu treiben, das Entleeren erfolgt durch Absaugen. Durch Silanisieren mit gelöstem MPTS (**2**, Schema 1) entsteht eine Thioloberfläche. Oligonucleotide mit freier Aminogruppe, die durch das Maleinimid-Vernetzungsreagens GMBS (**18**, Schema 2) modifiziert waren, wurden in Volumina von 5–10 nL mit einer piezoelektrischen Kapillardüse aufgetragen,^[35] da Array-Glasplatten keine Kontaktdruckverfahren vertragen. Die erhaltenen Spots haben mit ca. 200 μm nur ca. 60% der Größe von Spots auf planaren Chips, und bei ihnen tritt der „Kaffee-Ring“-Effekt nicht auf. Da diese Chips ähnlich funktionalisiert werden können wie ebene Träger, bietet die dreidimensionale Struktur in Bezug auf die Zunahme der Gesamtmenge an immobilisiertem Oligonucleotid keinen Vorteil. Diese Chips haben zwar einen etwas höheren Fluoreszenzhintergrund als Glasplatten, ergeben aber dennoch ein 44-mal höheres Hybridisierungssignal als ebene Chips. Diese Steigerung wurde auf eine größere Oberfläche für jeden Sondenort zurückgeführt, was eine niedrigere Sondendichte bei gleicher Beladung bedeutet.

2.1.2. Düsen

Die Abgabe von Reagentien für die Mikroarray-Herstellung durch Düsen haben mehrere Arbeitsgruppen beschrieben. Hierbei gibt es keinen direkten Kontakt zur Oberfläche wie bei den Spotting-Methoden. Blasenjets sind einfache, für Drucker entwickelte Halbleitervorrichtungen, die eine Flüssigkeit aus einer Düse durch rasches Erhitzen ausstoßen. Wissenschaftler bei Canon haben die DNA-Abgabe in einem Lösungsmittel beschrieben, das Glycerin, Harnstoff und Thiodiglycol als Benetzungsmittel enthält.^[37] Thermische Belastungen und Scherkräfte des Blasenjets schädigen DNA

von 10-300 nt nicht. Bis zu zwölf verschiedene Oligonucleotidlösungen konnten in 24-pL-Volumina verteilt werden und bildeten Spots von 70 µm. So aufgetragene 18mere 5'-Thiololigonucleotide wurden an Maleinimid-modifizierten, aminierten Glasträgern immobilisiert. Ein Düsensystem, das bei Bedarf Tropfen abgibt und zehn unabhängige Flüssigkeitskanäle in einem integrierten piezoelektrischen Blockdruckkopf (siehe Abschnitt 3.2) enthält, wurde von MicroFab entwickelt.^[38] Düsenöffnungen mit einem Durchmesser von 40 µm und 2 mm Abstand geben die Oligonucleotide in 20 proz. wässrigem Ethylenglycol ab. Dazu muss der Druckkopf in einem Abstand von weniger als 200 µm zu einem GPTS-derivatisierten Träger gebracht werden.

2.1.3. Andere Methoden

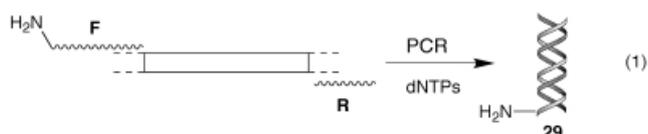
Bei CIS Bio wurde eine Methode entwickelt, bei der Oligonucleotide direkt auf Platinminielektroden elektropolymerisiert werden.^[39] Diese Oligonucleotide **28** (Schema 6) enthalten am 5'-Ende 5-Methylcytidin, das am N4-Atom mit Pyrrol verknüpft ist. Die Oxidation durch wiederholten Potentialdurchlauf in Gegenwart eines ca. 10000fachen Pyrrolüberschusses liefert eine 50-nm-Schicht aus Polypyrrol, in die anteilig Oligonucleotid-haltige Pyrrole eingelagert sind.

Bei Nanogen wurden die Parameter, die bei der Herstellung und Verwendung von Mikroarrays verändert werden können, um eine Variable erweitert: das elektrische Feld.^[40] Das Konzept dieser Methode gleicht dem der Elektrophorese, nur dass sich die Moleküle in Lösung frei bewegen können. Das Verfahren beruht auf einem Array aus nicht weniger als 10000 je 25 µm kleinen Platinmikroelektroden auf einem Siliciumwafer, der mit einer für Halbleiter üblichen Technik hergestellt wird. Die Elektroden werden mit einer 1–10 µm dicken Permeationsschicht aus Streptavidin-Agarose überzogen, die nicht nur die DNA vor schädlichen Elektrodenreaktionen schützt, sondern auch die mit Biotin derivatisierten 12- bis 26meren Oligonucleotidsonden **30** immobilisiert, die durch ein positives elektrisches Feld an der Elektrodenfläche konzentriert werden. Die Bewegung der DNA im elektrischen Feld erfordert einen Puffer mit niedriger Leitfähigkeit, z. B. Histidin. Bei einfachen 5 × 5- und 10 × 10-Arrays kann jede Elektrode direkt extern elektrisch angeschlossen werden. Kompliziertere Arrays können eigene CMOS (complementary metal oxide semiconductor)-FET (field effect transistor)-Verknüpfungen haben, um jede Elektrode zu steuern, sodass die Zahl externer Anschlüsse möglichst gering ist. Die wirksame Fläche des Arrays beträgt 2–4 mm². Da das Feld an der Elektroden-immobilisierten Sonde gesteuert werden kann, lässt sich der Analyt aus verdünnter Lösung an die Elektrode dirigieren, sodass während der Hybridisierung eine weitere Art der Steuerung stattfindet: der „elektronische Zwang“.

2.2. Biologisch erhaltene Nucleinsäuren

Viele biologische Untersuchungen mit Mikroarrays gehen von einem Satz von Klonen aus, deren Wirkungen und Sequenzen unbekannt sein können. Die Testanordnung wird

demnach nicht auf der Basis einer Sequenz entwickelt, sondern die Klone selbst werden in Sonden überführt, mit denen sich zelluläre RNA nachweisen lässt. Das gelingt im Allgemeinen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR ermöglicht nicht nur die Produktion großer Mengen einer bestimmten Nucleinsäure durch Replikation, sondern während einer PCR können auch bestimmte reaktive chemische Gruppen oder Markierungen eingeführt werden [Gl. (1)], weil alle Produktmoleküle **29** entweder von Primern oder von Desoxynucleotidtriphosphaten abgeleitet sind. Diese Herstellungstechnik für Mikroarrays wird heute in biologischen Laboratorien am häufigsten angewendet, und viele der benötigten Ausrüstungen sind inzwischen kommerziell erhältlich.



Die erste breitere Anwendung von DNA-Chips zur Untersuchung der Genexpression stammt von zwei Arbeitsgruppen in Stanford.^[41] Die Verfahren zur Chip-Herstellung sind eingehend beschrieben, vielfach übernommen und variiert. Für diese Technologie sind mit Polylysin beschichtete, kommerzielle Träger ein gutes Ausgangsmaterial. Die Sonden-DNA haftet an dieser Oberfläche, zumindest anfangs, durch elektrostatische Wechselwirkungen, und diese Adhäsion wird durch Hybridisierung mit der zu analysierenden DNA nicht unterbrochen. Mit einem Stift (Abbildung 2) werden 5 nL eines PCR-Produkts (> 1 kb) zu Spots < 350 µm aufgebracht. Die Zugabe von 1.5M Betain zum Spotting-Puffer verbessert die Homogenität des Spots (kein „Kaffee-Ring“), erhöht die Viskosität, verlangsamt das Verdunsten, ohne die Oberflächenspannung, die das Spreiten verhindert, zu beeinflussen, und erhöht das Signal auf das 2.5fache.^[42] Der Stift bewegt sich an einer Brücke über einen X,Y-Tisch. Nach der Hydratation in einer feuchten Umgebung werden die Spots rasch getrocknet. Die aufgetragene DNA kann auch photochemisch mit dem Träger vernetzt werden. Dieses Verfahren ist bei der Veränderung von DNA an Membranen schon lange bekannt; die Anknüpfung kann durch nucleophile Substitution der Lysin-Aminogruppe an T erfolgen.^[43] Die übrigen Aminogruppen an Polylysin werden mit Bernsteinsäureanhydrid in Boratpuffer oder in einem organischen Lösungsmitteln blockiert,^[42] wodurch die in wässrigen Lösungsmitteln manchmal auftretende Spreitung der DNA auf dem Träger verhindert wird. Zur Herstellung der Hybridisierungsonden wird der Array erhitzt, um das doppelsträngige PCR-Produkt zu denaturieren.

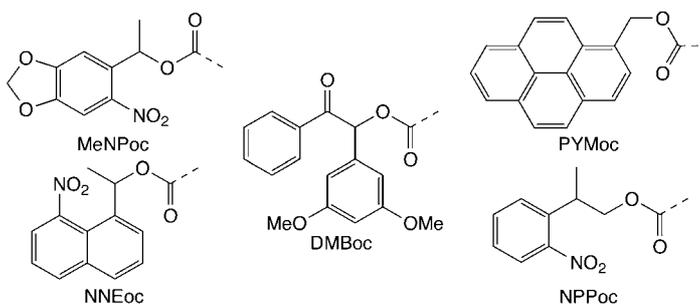
Eine andere kovalente Verknüpfung stammt ebenfalls von den Arbeitsgruppen in Stanford. Die von den 5'-Aminoprimern **29** (Schema 6) produzierten PCR-Produkte ermöglichen die Verwendung eines anderen handelsüblichen Trägers, der mit einem Silanaldehyd **5** beschichtet ist. Nachdem 1056 PCR-Produkte wie oben aufgetragen worden waren, wurde der Array 5 min mit NaBH₄ inkubiert, um das Imin zu reduzieren.^[44] Der Vorteil dieser Methode ist die wegen der

geringen Hintergrundfluoreszenz zehnmal höhere Empfindlichkeit, durch die sich noch mRNA nachweisen lässt, die dem 1/500000tel der gesamten mRNA in einer Probe entspricht. Ein Nachteil der Aldehydträger ist, dass sie an der Luft zur Säure oxidieren können. Anderen Arbeiten zufolge können 5'-aminierte PCR-Produkte (Tropfen von 1 nL ergeben Spots von 400 μm in 1000 μm Abstand) auch mit Carbodiimiden an Carbonsäure-beschichtetes Glas (TETU, 6, Schema 1) gekuppelt werden.^[45]

Die elektrostatische Bindung von PCR-Produkten an APTES-Träger in Gegenwart von 3–5 M Natriumthiocyanat wurde von Wissenschaftlern bei Molecular Dynamics beschrieben.^[46] Obwohl keine weitere Behandlung oder Blockierung erfolgt, bleibt ein erheblicher Anteil der abgesetzten DNA während der Hybridisierungs- und Waschschriffe erhalten. Das Spotting-Gerät, Gen III, dieser Firma gibt nL-Volumina der DNA aus zwölf gleichen Federn ab, die aus Edelstahlkapillaren mit einem Schlitz in einer Wand bestehen (Abbildung 2).

3. In-situ-Synthese

Eine frühere Übersicht über räumlich gerichtete kombinatorische Chemie behandelt auch Methoden für die In-situ-Synthese von DNA-Chips.^[2] Ein besonders wichtiger Punkt der In-situ-Synthese ist, dass sie eine kombinatorische Methode ist, mit der wesentlich mehr Verbindungen hergestellt werden können als die Synthese Stufen hat. Durch den Einsatz der neuen Geräte haben sehr schnell ablaufende sequentielle Synthesen inzwischen allerdings einen Stand erreicht, in dem sie zeitlich mit einigen parallelen Synthesemethoden konkurrieren können. Für die In-situ-Synthese von Oligonucleotiden gibt es zwei Strategien. Jeder Syntheseyklus besteht aus der Deblockierung und Kupplung, einer der Schritte verläuft an spezifischen Sondenorten, während der andere Schritt an allen Positionen gleichzeitig durchgeführt werden kann. Ein wichtiger Aspekt ist die Richtung der DNA-Synthese, denn einige Assays benötigen DNA mit freien 3'-Enden (siehe Abschnitt 2.1). Bei den oben beschriebenen aufgetragenen Arrays gelingt die Anknüpfung an einem anderen als dem 3'-Ende einfach durch automatisierte Synthese. Die konventionelle DNA-Synthese verläuft in der Richtung 3' \rightarrow 5', demnach muss für in situ synthetisierte Arrays die DNA an ihrem 3'-Ende gebunden sein. Amidite mit umgekehrter Orientierung (5'-Phosphoramidit, 3'-Dimethoxytrityl) sind kommerziell erhältlich und können in Düsen und bei physikalischen Maskierungsverfahren eingesetzt werden. Für photolithographische Synthesen müssen sie aber mit geeigneten photochemisch abspaltbaren Gruppen hergestellt werden (Schema 8). Ferner ist durchaus vorstellbar, die DNA auf normalem Weg zu synthetisieren und danach die Verknüpfung umzukehren, dies wurde bisher aber nur an Polymer-Beads durchgeführt.^[47] Die Syntheserichtung kann ein entscheidender Punkt sein, denn es hat sich gezeigt, dass Insertions- und Deletionsmutationen im Tumor-Suppressorgen p53 durch Hybridisierungsassays mit dem GeneChip nicht,^[48] durch Primerverlängerungsassays dagegen leicht nachzuweisen sind.^[49]



Schema 8. Photochemisch abspaltbare Schutzgruppen für die Synthese von DNA-Mikroarrays.

3.1. Photolithographie

Das Herstellungsverfahren für Mikroarrays von Affymetrix ist inzwischen ein sehr bekannter Prozess. Eine Oberfläche wird mit Linkermolekülen beschichtet, die lichtempfindliche Schutzgruppen tragen. Durch Bestrahlen in einem (durch Schablonen festgelegten) Muster werden bestimmte Bereiche deblockiert und an monomere Einheiten gekuppelt, die der ganzen Oberfläche ausgesetzt sind. Dieser Vorgang wird wiederholt, um an verschiedenen Stellen unterschiedliche Sequenzen aufzubauen. Mit der kombinatorischen Synthese können 4^l unterschiedliche Sequenzen der Länge l in $4 \times l$ chemischen Stufen hergestellt werden. Diese Methode wurde in einer Übersicht – in erster Linie für die Peptidsynthese – ausführlich behandelt,^[2] und über ihre Anwendung zur Herstellung von DNA-Chips gibt es eine gute Zusammenfassung.^[50]

Die erste Arbeit von Wissenschaftlern bei Affymetrix über die Anwendung dieses Verfahrens zur Herstellung von DNA-Arrays nutzte die lichtempfindliche MeNPoc-Schutzgruppe (Schema 8), um DNA-Sondensequenzen (>200) herzustellen.^[51] Als Schutzgruppen für die Nucleobasen dienen Phenoxyacetyl (Pac) für A und Isobutyryl für G und C; diese so genannten „Easy-off“-Gruppen^[52] werden mit Ethylendiamin oder Ethanolamin in Ethanol in 4 h bei Raumtemperatur leicht abgespalten. Der mit Bis(hydroxyethyl)aminopropyltriethoxysilan (HE-APTS, 7, Schema 1) beschichtete Träger wird durch Behandeln mit dem MeNPoc-Hexaethylenglycolphosphoramidit 20 (Schema 2) für die Synthese vorbereitet.

In späteren Arbeiten bei Affymetrix^[53] konnte die Zahl der bei jedem Syntheseschritt gebildeten 5'-Hydroxygruppen bestimmt werden, indem diese mit Fluorescein derivatisiert und abgebildet wurden. Dabei stellte sich heraus, dass die photochemische Deblockierung strikt einer Reaktion erster Ordnung folgt und die Halbwertszeiten für jede monomere Einheit 9–13 s bei 27.5 mW cm⁻² betragen. Auch der Einfluss von Lösungsmitteln auf die Geschwindigkeit der Photodeblockierung wurde untersucht: Am besten verlief die Reaktion in einem unpolaren Lösungsmittel oder ohne Lösungsmittel. Während früher bei der photochemischen Abspaltung von Nitrobenzylgruppen Reagentien zum Abfangen von Nitrosoaldehyd-Nebenprodukten zugegeben wurden, scheint das bei der MeNPoc-Gruppe nicht nötig zu sein. Die mit einer ähnlichen Fluoreszenz-Methode bestimmten durchschnittlichen Ausbeuten für den Zyklus einer DNA-

Synthese auf der Basis von MeNPoc-Schutzgruppen liegen bei 91–98%. Der Grund für diese niedrigen Zyklusausbeuten in Mikroarrays ist unklar, denn in Lösung verlaufen die photochemische Deblockierung und die Kupplung mit sehr hohen Ausbeuten. Niedrige Zyklusausbeuten bedeuten, dass die Reinheit dieser *in situ* synthetisierten Sequenzen ziemlich gering ist, aber die Zahl exakter Sonden mit voller Länge ist immer noch beträchtlich und reicht offenbar für eine Anwendung aus. Werden die Träger vor der Derivatisierung und Synthese durch rasches Drehen mit einem ca. 0.4 µm dicken Film aus kolloidalen, 70–100 nm großen Siliciumdioxidteilchen beschichtet, so nimmt ihre Oberfläche auf das Siebenfache zu. Vermutlich ist eine höhere Sondendichte der Grund für eine entsprechende Zunahme des Hybridisierungssignals.^[54]

Den Einfluss defekter Sequenzen auf das Hybridisierungsvermögen von *in situ* hergestellten Mikroarrays wurde mit synthetischen Gemischen untersucht. Nicht überraschend ist, dass eine höhere Sondenreinheit angestrebt wird, um die Leistung der Mikroarrays zu verbessern.^[55] Um Mängel der MeNPoc-Gruppe in der DNA-Synthese zu umgehen, wurden zahlreiche lichtempfindliche Schutzgruppen und ihre Leistungen in einfachen photochemischen Festphasensynthesen sowie an Arrays untersucht (Schema 8). Dazu gehören die DMBOc,^[56] die PyMoc,^[57] und die NNEoc-Gruppe,^[57] die alle Zyklusausbeuten von 96% liefern. Einer anderen Arbeit zufolge führt die NPPoc-Gruppe bei der photochemischen Synthese an Arrays zu quantitativen Zyklusausbeuten und bietet damit einen erheblichen Fortschritt.^[58] Die genannten Gruppen unterscheiden sich in ihrem Abspaltungsmechanismus. Er verläuft bei MeNPoc- und NNEoc-Gruppen nach der für Nitrobenzylgruppen üblichen Photoreaktion, wobei ein Sauerstoffatom von der Nitrogruppe an die Benzylposition wandert und ein Nitrosohemiketal entsteht. Dieses reagiert weiter zum Nitrosocarbonyl und liefert einen Hemicarbonat-ester, der zum Alkohol decarboxyliert. Die DMBOc- und die PyMoc-Gruppe sollen photolytisch in ihre Kationen und das Hemicarbonat gespalten werden. NPPoc ist eine relativ neue Schutzgruppe, die durch lichtgestützte β-Eliminierung in Gegenwart einer schwachen Base abgespalten wird. Sie wird in Nitrostyrol überführt, wobei das Hemicarbonat entsteht.

„Genechip Mikroarrays“ von Affymetrix werden an 5-Inch-Trägern aus gesintertem Siliciumdioxid mit 50–400 Wiederholungsarrays hergestellt, von denen jeder bis zu 1.6 cm² misst und bis zu 400 000 Sonden trägt. Die Abspaltung der MeNPoc-Gruppen durch ein Belichtungssystem mit gefilterter I-Linie (365 ± 10 nm, 1 kW) benötigt in jedem Zyklus weniger als 1 min. Die lösungsmittelfreie Abspaltung der MeNPoc-Gruppen ist vorteilhaft, weil so ein Kontakt-druckverfahren verwendet werden kann, bei dem die Schablonen direkt gegen den Wafer gesetzt werden. Vollständige Wafer werden in einzelne Arrays zerschnitten und in einen Kunststoffträger gepackt, dessen Öffnungen eine Zugabe von Hybridisierungslösungen ermöglichen. Derzeit sind Chips mit einer Größe von 50 µm erhältlich, aber die Technologie der nächsten Generation wird sie auf ca. 25 µm senken.

Eine andere, von Affymetrix gemeinsam mit IBM entwickelte photolithographische Methode nutzt herkömmliche Halbleiterphotolacke als physikalische Zwischichtbarriere gegen konventionelle chemische Reagentien für die DNA-

Synthese (Abbildung 4).^[59] Ein derivatisierter und DMTr-geschützter Standardglasträger wurde mit einem löslichen Polyimid (ca. 0.5 µm) beschichtet, um die Moleküle vor Reaktionen mit den Kopierlacken zu schützen. Darüber lag

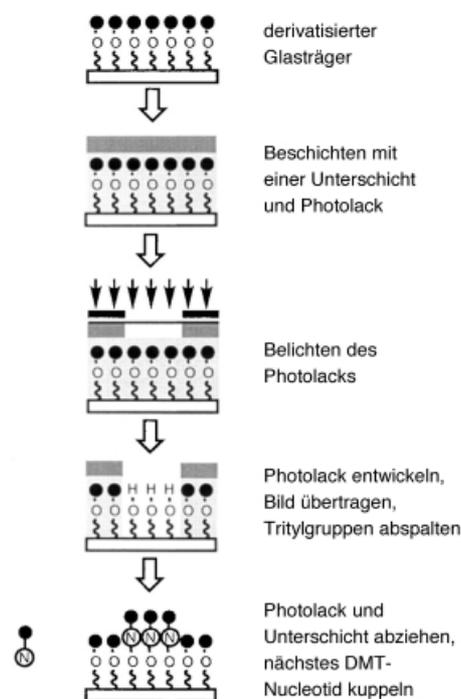
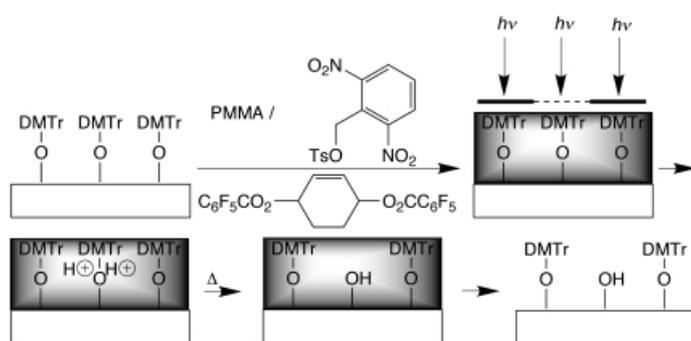


Abbildung 4. Photolithographische DNA-Synthese mit einem Kopierlack-Doppelschichtsystem (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [59], Copyright (1996) National Academy of Sciences, U.S.A.).

als negativ getönte Kopierlackschicht (ca. 0.5 µm) ein Epoxidharz kombiniert mit einem lichtempfindlichen Säurebildner, der das Harz quervernetzt und so unlöslich macht. Diese Strategie beruht auf fundierten Erfahrungen mit den Säurebildenden, chemisch verstärkten Kopierlacksystemen, die derzeit in der Submikron-Lithographie für Computerchips verwendet werden.^[60] Hier ermöglicht eine durch Licht gebildete Säure (photo-generated acid, PGA) die rasche Produktion von Spots mit einem Durchmesser von 4 µm. Nach dem Entwickeln des Epoxids aus unbelichteten Flächen mit Cyclohexanon wurde das darunter liegende Polyimid mit Anisol abgelöst. Die 5'-DMTr-Schutzgruppen wurden mit Dichloressigsäure in Cyclohexanon abgespalten, um ein Auflösen des Polyimids zu vermeiden. Nach dem Lösen aller Polymere in einem chlorierten Lösungsmittel war die Oberfläche für die Phosphoramiditkupplung vorbereitet, die mit 90 ± 5% Ausbeute pro Stufe verlief. So erhaltene Mikroarrays von Decanucleotiden mit einem Spottdurchmesser von 100 µm hatten ein ähnliches Leistungsvermögen wie die mit MeNPoc hergestellten.

Ein anderer Zugang zur lichtgesteuerten DNA-Synthese verwendet konventionelle säureempfindliche Hydroxyschutzgruppen in Verbindung mit chemisch amplifizierten Polymerfilmen, die durch einen lichtempfindlichen Säurebildner entstehen (Schema 9).^[61] Die anfangs gebildete *p*-Toluolsulfonsäure liefert zwei Äquivalente Pentafluorbenzoesäure, deren Acidität ausreicht, um DMTr-Gruppen ohne Depuri-



Schema 9. DNA-Synthese durch eine photochemisch erzeugte Säure. Ts = Toluol-4-sulfonyl, PMMA = Polymethylmethacrylat.

nierung der Nucleoside abzuspalten. Da die katalytische Abspaltung der DMTr-Gruppen in einer diffusionsfähigen Säure abläuft, könnte man befürchten, dass die photochemisch gebildete Säure zu einer wahllosen Deblockierung führt, aber ein Polymethylmethacrylatfilm begrenzt die seitliche Diffusion und ermöglicht die Bildung von Spots, die kleiner als $10\ \mu\text{m}$ sind. Die mit diesem Verfahren bisher erhaltenen Zyklusausbeuten von ca. 90 % sind aber immer noch erheblich niedriger als gewünscht. Besonders reizvoll an der Methode ist, dass die chemische Amplifizierung im Säurebildungsschritt zu einer nichtlinearen Abhängigkeit der Deblockierung von der Lichtdosis führt. Diese Nichtlinearität der photochemischen Antwort ist der Schlüssel zur Produktion kleiner Spots bei konventionellen lithographischen Verfahren.^[62]

Die umgekehrte Syntheserichtung (siehe Abschnitt 2.1), die zu einer DNA mit freiem 3'-Ende führt, lässt sich durch Austausch der Schutzgruppen und der Phosphoramiditgruppe in den Monomereinheiten (Schema 10) und allgemein durch Verlängern der Kupplungszyklen durchführen. Bei Affymetrix wurde kürzlich die Herstellung der Monomereinheit **32** mit einer 5'-Phosphoramidit- und 3'-MeNPoc-Gruppe für



Schema 10. Amiditregentien für die Synthese von DNA mit freiem 3'-Ende. PRG = MeNPoc, NPPoc.

diesen Zweck entwickelt.^[50] Die Methode wurde auch auf die NPPoc-Gruppe übertragen und lieferte Sequenzen hoher Qualität, die in enzymatischen Verfahren eingesetzt werden können.^[63] Im Prinzip sollten die neueren Methoden der Deblockierung durch photochemisch gebildete Säuren auch DNA-Arrays mit freien 3'-Enden leichter zugänglich machen, da die 3'-DMTr-5'-Phosphoramidite **31** kommerziell erhältlich sind. Das verdeutlicht auch den Vorteil einer Verwendung konventioneller Monomereinheiten, die für viele Nucleotidanaloga mit zahlreichen Basen- und Zuckervariationen erhältlich sind.

Zwei Methoden wurden entwickelt, die die in der Affymetrix-Methode verwendeten starren Schablonen durch dynamisch programmierbare Vorrichtungen ähnlich den Computer-Overhead-Projektions-Systemen ersetzen. An der University of Wisconsin nutzte man eine digitale Anordnung aus Mikrospiegeln^[64] in einer Projektionsoptik der Firma NimbleGen (Abbildung 5).

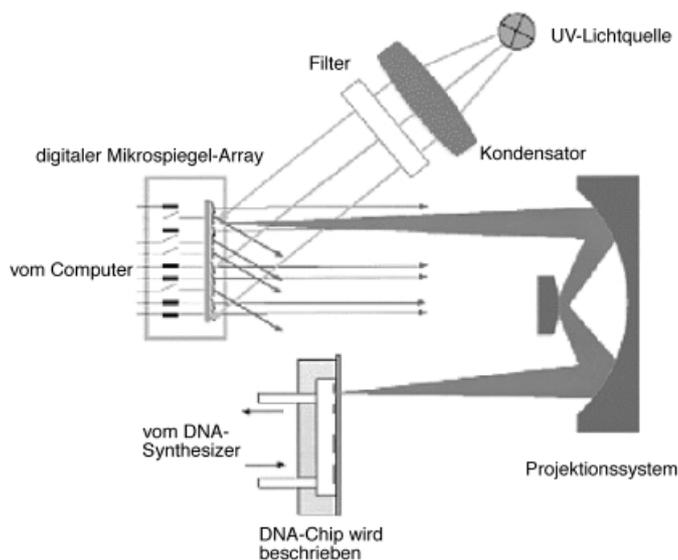


Abbildung 5. Reflexionsoptik für die Photolithographie mit Mikrospiegelanordnung (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [64]).

Eine ähnliche, an der University of Houston entwickelte Technik^[65] wird von Xeotron vermarktet. Die erste für diese Methode eingesetzte Strukturierungsvorrichtung ist ein $1,5 \times 1,5\ \text{cm}^2$ großer quadratischer Glasträger mit Rillen aus Fluorkohlenstoff, die bis zu 48×48 Syntheseregionen mit nur $300\ \mu\text{m}$ kleinen Vertiefungen umgeben. Diese Substrate werden nach der in Abschnitt 3.2 beschriebenen Methode von der Firma Protogene hergestellt und anschließend mit einem Hydroxybutyramidsilan (HBPTES, **8**) derivatisiert. Die Synthese beginnt mit der Kupplung von zwei T-Basen durch konventionelle saure Deblockierungen. Durch Eintauchen des Chips in eine Lösung der Vorstufe für die lichtempfindliche Säure bleiben nach dem Ablaufen flüssige Tröpfchen in den Mikrovertiefungen zurück. Die photochemische DMTr-Abspaltung, die durch Festphasensynthese von DNA nachgewiesen wurde (Zyklusausbeuten $> 92\%$),^[66] ist auf einzelne Mikrovertiefungen gerichtet und projiziert das Licht über eine Anordnung aus 480×640 quadratischen Mikrospiegeln ($16 \times 16\ \mu\text{m}^2$). Die Effizienz der Deblockierung wurde anhand der Zahl der gebildeten 5'-Hydroxygruppen bestimmt (als Fluoresceinderivat mit der Affymetrix-Methode gemessen) und optimiert; als hervorragend geeignetes Gemisch für die photochemische Säurebildung erwies sich dabei eine Lösung aus einem Diaryliodoniumsalz (mit kurzer Wellenlänge λ_{max}) und einem Thioxanthenon-Sensibilisator (der die Strahlung absorbiert) in Methylenechlorid. Mit dieser Methode wurden Oligonucleotide mit bis zu 30 Resten hergestellt.

3.2. Düsen

Als Alternative zu den Licht-gesteuerten Reaktionen an mikroskopisch kleinen Stellen können Reagentien für die konventionelle DNA-Synthese mit den gleichen Verfahren gezielt abgegeben werden, die in Abschnitt 2.1.2 für die Abgabe kompletter Oligonucleotide beschrieben sind. In den ersten Arbeiten auf diesem Gebiet der Firma Combion wurden coaxiale piezoelektrische Glaskapillardüsen verwendet (Abbildung 6).^[67] An den Träger wird ein Polyethylenglycol-Linker mit einer DMTr-Schutzgruppe gebunden. Eine

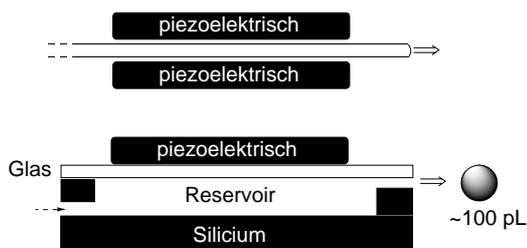
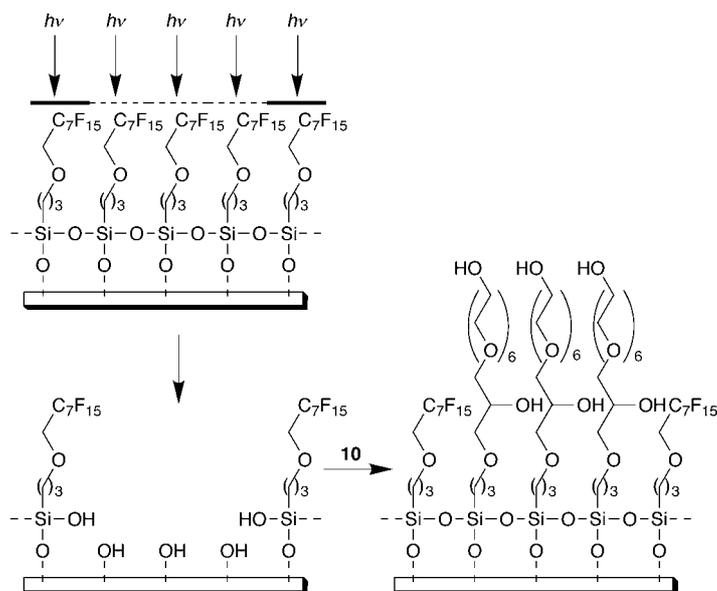


Abbildung 6. Piezoelektrische Glasdüsen für die Reagentienabgabe.

Düse verteilt das Deblockierungsreagens aufwärts zu den vorgesehenen Syntheseorten an dem horizontal gehaltenen Träger. Dieser wird zum Spülen in eine vertikale Position gebracht und für die Kupplungsreaktionen in eine mit dem DNA-Synthesizer verbundene Durchflusszelle gesetzt. Der Gesamtzyklus dauert 10 min. Eine vorsichtige Schätzung der Stufenausbeuten in diesem Prozess liegt bei 91%. Da bei der Verwendung flüchtiger Lösungsmittel wie Acetonitril häufig Probleme in den Düsen auftreten, erwies es sich als vorteilhaft, das weniger flüchtige, aber genauso wirksame Deblockierungsmittel $ZnBr_2$ in CH_2Br_2 /Isopropanol einzusetzen.

Das Verfahren der Firma Protogene isoliert jede Syntheseregion von den anderen durch nichtbenetzende, Fluoralkan-haltige Regionen oder Rillen (Schema 11).^[68] Zur Herstellung einer Mikroarray-Glasplatte wird zuerst die Glasplatte mit (Perfluorocetyloxy)propyltriethoxysilan (POPTS, **9**) in der Gasphase beschichtet und dann mit einem CO_2 -Laser durch eine Schablone bestrahlt, um das Silan zu entfernen. Anschließend werden die gemusterten Regionen für die Synthese durch Derivatisieren mit GPTS erzeugt und das Epoxid mit Hexaethylenglycol (HEG) geöffnet. Piezoelektrische Impulsstrahlpumpen, die als mikroelektromechanisches System (MEMS) hergestellt werden, sind ein weiterer neuer Aspekt dieser Methode. Vorratsbehälter, Zulauf und Düse sind als wichtige dreidimensionale Merkmale in eine Keramik eingebaut (Abbildung 6). Um eine Kammer zu bilden, ist die Keramik an eine bewegliche Deckplatte gebunden, an der sich ein piezoelektrisches Element befindet. Wenn die Piezoelektrik aktiviert wird, deformiert sie den Vorratsbehälter wie ein Federbalg, sodass dieser Flüssigkeit mit einer Geschwindigkeit von $1-10\text{ m s}^{-1}$ ausstößt. Eine Düsengröße von $40\text{ }\mu\text{m}$ erzeugt Acetonitriltröpfchen von ca. 33 pL ($\pm 5\%$), von denen drei einen Syntheseort von $50\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser füllen. Diese Pumpen arbeiten bei bis zu 3 kHz , können ein Ziel von $250\text{ }\mu\text{m}$ Größe aus 2 cm Abstand treffen



Schema 11. Herstellung einer Oberfläche mit Syntheseregionen, die von nicht benetzenden Bereichen umgeben sind.

und lassen sich in Druckköpfen zusammenfassen (bis zu 64 Düsen in $400\text{-}\mu\text{m}$ -Abständen), um so unabhängig regulierbare Düsen zu schaffen, die dasselbe Reagens aus einem gemeinsamen Reservoir abgeben. Die Druckköpfe sind aufeinander gesetzt, sodass jede Base als Phosphoramidit oder H-Phosphonatmonomer mit dem zugehörigen Aktivator für die Oligonucleotidsynthese bereitsteht. Die Position der Pumpen wird während der Synthese nicht verändert, stattdessen wird unter ihnen der Mikroarray auf einem X,Y-Tisch bewegt. Mit einer Wiederholungsfrequenz von 1 kHz kann die Pumpe Monomereinheiten auf einem 512×512 -Array ($262\,000$ Positionen) in nur 32 Sekunden absetzen! Die Oberflächenspannung an den Syntheseorten von 47 dyn cm^{-1} passt eher zu der von Acetonitril (**29**) als zu der von den Fluoralkanregionen (**18**), wodurch ein Vermischen zwischen benachbarten Positionen verhindert wird. Gemeinsame Syntheseschritte, Waschen, Blockieren, DMTr-Abspaltung und abschließende Phosphitoxidation/Deblockierung können als Batch-Arbeitsgänge simultan für den ganzen Mikroarray durchgeführt werden. Die Zykluszeiten betragen 6 min je Rest.

Eine ähnliche Technologie wird bei Rosetta für die Mikrofabrikation monolithischer Düsen aus Glas, Silicium (Düse $10-100\text{ }\mu\text{m}$) und piezoelektrischer Keramik verwendet, die 100-pL -Volumina abgeben.^[69] Diese Methode verwendet Propylencarbonat als Lösungsmittel für die Synthese, das sich wegen seiner hohen Oberflächenspannung ($>30\text{ dyn cm}^{-1}$), geringen Flüchtigkeit und hohen Viskosität besonders eignet.^[70] Mit dieser Technik lassen sich Mikroarrays aus mehr als $25\,000$ verschiedenen 60meren herstellen, die von Agilent vertrieben werden.

3.3. Physikalische Maskierung

Diese Technik ähnelt der Verwendung von Schablonen und ist in einer früheren Übersicht umfassend beschrieben.^[2] Sie

wird hauptsächlich an der University of Oxford und bei der Firma Beckman verwendet, deren Arbeitsgruppen auch kooperieren. Bei Beckman wurde die ungewöhnliche Trägeranknüpfung **11** (Schema 1) durch Behandeln einer Polypropylenfolie mit Ammoniak in einem Plasma entwickelt.^[71] Dadurch entstehen tertiäre Aminogruppen, die direkt mit Nucleosidphosphoramidit-Monomeren umgesetzt und anschließend zu Phosphoramidaten oxidiert werden können. Als Linker dient eine Sequenz aus zehn T-Resten. Die Folien können in Streifen von 2 mm geschnitten werden, sodass man „Messstäbchen“-Arrays erhält. Methoden zur Herstellung von Arrays an aminiertem Polypropylen (AP) oder Glas, darunter das GPTS/HEG-derivatisierte Glas **10**, von dem sich das Oligonucleotid nicht ablösen kann, stammen von der Arbeitsgruppe in Oxford.^[72] Das Polypropylen muss auf einen Glasträger aufgebracht werden, damit es starr genug ist, um gegen die Schablone abzuschließen und eine zuverlässige Translation relativ zu ihr möglich ist. Polypropylen-Arrays wurden mit den 3'-DMTr-5'-phosphoramiditen **31** hergestellt, die freie 3'-Enden für enzymatische Verfahren liefern.^[73] Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Hybridisierungsdaten nicht so eindeutig und leicht zu interpretieren sind wie die Daten konventioneller Mikroarrays.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Da viele Methoden zur Herstellung von Mikroarrays verfügbar sind, ist es sinnvoll, ihre jeweiligen Stärken und Schwächen in Betracht zu ziehen. Arrays aus cDNA und solche aus synthetischen Oligonucleotiden (entweder zuvor synthetisiert und anschließend aufgetragen oder in situ synthetisiert) unterscheiden sich in ihrer Verwendung erheblich. Um die zuerst genannten Arrays zu bilden, muss man im eigenen Labor eine cDNA zur Verfügung haben. Diese Herstellungsart ist in biologischen orientierten Arbeitsgruppen, die an maßgeschneiderten Mikroarrays interessiert sind, verbreitet. Sie bietet zudem längere Sonden, die von manchen bevorzugt werden. Die Verwendung synthetischer Oligonucleotide bedeutet, dass man Sonden entwickeln kann, die nur auf einer in Gendatenbanken vorkommenden Sequenz beruhen. Ihre Länge ist derzeit allerdings durch die Effizienz der Synthese bei jeder Methode auf etwa 60 Nucleotide begrenzt. Die wichtige Frage, ob für die Herstellung und Analyse von Mikroarrays eine Methode bevorzugt ist, lässt sich ohne Kenntnis der individuellen Anforderungen und Hilfsmittel nicht beantworten. In ihrem Leistungsvermögen aber unterscheiden sich Arrays aus 50meren Oligonucleotiden und solche aus cDNAs/PCR-Produkten mit mehr als 300 Basenpaaren nicht.^[13]

Ein Gebiet stetiger Forschung sind die Qualitätskontrolle und Überwachungsmethoden für chemische Reaktionen an/ auf Mikroarrayträgern. Es sind verschiedene Techniken für chemische Untersuchungen an DNA-Mikroarrays eingesetzt worden, meist waren sie aber nicht schnell genug, um von Nichtspezialisten als Teil der Routineabläufe im Labor eingesetzt zu werden, oder sie erfordern ziemlich komplizierte Geräte, die in vielen Chemie- und Biologie-Laboratorien nicht zur Verfügung. Da SPR-Techniken bei der Untersu-

chung von anderen Arten der biologischen Erkennung erfolgreich eingesetzt wurden (z.B. in BiaCore-Geräten), setzt man auch in die zukünftige Verwendung der SPR-Bildgebung bei Mikroarrays große Hoffnung. Ebenso könnte die neue Technik der Reflektorinterferenzspektroskopie angewendet werden.^[74]

Ein weiteres Gebiet, auf dem stetige Verbesserungen für DNA-Arrays erforderlich sind, ist überraschenderweise die Oligonucleotidsynthese, die allgemein als ein „perfektioniertes“ Verfahren angesehen wird. Ob das Problem nun die Effizienz eines photolithographischen Synthesesyklus oder die Reinheit eines Oligonucleotids ist, das durch konventionelle automatisierte Synthese mit einer neuen Verknüpfungsfunktionalität hergestellt wurde, – viele, die auf diesem Gebiet arbeiten, stellen fest, dass Fehler in der Synthese auch noch bei der Produktion von Mikroarrays zu Problemen führen.

Sicher gibt es die Tendenz, aus den in Abschnitt 2 angeführten Gründen, kleinere Sondenorte zu produzieren. Inzwischen können sogar Femtoliter abgesetzt werden, um Arrays mit 20-µm-Spots herzustellen.^[75] Allerdings gibt es eine Grenze, bis zu der die Bildung kleinerer Testorte zur Analyse der Mikroarrays positiv beiträgt, denn die Nachweismethoden für die Produkte sind der Optik und der Beugung wegen begrenzt. Selbst wenn Sondenorte mit einer Größe von 1000 nm hergestellt werden könnten, wäre eine statistisch stichhaltige Zahl von Datenpunkten durch Abfragen eines derartigen Ortes mit 650-nm-Strahlung nur sehr schwer zu erhalten. Dichteverbesserungen bei der Herstellung erfordern in gleichem Maß Verbesserungen der räumlichen Auflösung beim Nachweis.

Eingegangen am 18. August 2001 [A 488]

Übersetzt von Dr. Kathrin-M. Roy

- [1] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Liu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767–773.
- [2] M. C. Pirrung, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 473–488.
- [3] a) *DNA Microarrays. A Practical Approach* (Hrsg.: M. Schena), Oxford Press, New York, **1999**; b) *Microarray Biochip Technology* (Hrsg.: M. Schena), Eaton, Natick, **2000**; c) *Methods in molecular biology, Vol. 170: DNA arrays: methods and protocols* (Hrsg.: J. B. Rampal), Humana Press, Totowa, NJ, **2001**.
- [4] a) W. M. Freeman, D. J. Robertson, K. E. Vrana *Biotechniques* **2000**, *29*, 1042–1055; b) J. Wang, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 3011–3016; c) D. H. Blohm, A. Guiseppi-Elie, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 41–47.
- [5] C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3039–3043; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2865–2869.
- [6] W. W. Gibbs, *Sci. Am.* **2001**, *284*, 33–34.
- [7] J. E. Forman, I. D. Walton, D. Stern, R. P. Rava, M. O. Trulson, *ACS Symp. Ser.* **1998**, *682*, 206–228.
- [8] B. P. Nelson, T. E. Grimsrud, M. R. Liles, R. M. Goodman, R. M. Corn, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1–7.
- [9] a) E. P. Plueddemann, *Silane Coupling Agents*, Plenum, New York, **1991**; b) P. Silberzan, L. Leger, D. Ausserre, J. J. Bennattar, *Langmuir* **1991**, *7*, 1647–1651; c) A. Ullman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533–1554.
- [10] E. T. Vandenberg, L. Bertilsson, B. Liedberg, K. Uvdal, R. Erlandsson, H. Elwing, I. Lundström, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *147*, 103–118.
- [11] C. M. Halliwell, A. E. G. Cass, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2476–2483.
- [12] D. J. Lockhart, H. Dong, M. C. Byrne, M. T. Follettie, M. V. Gallo, M. S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Horton, E. L. Brown, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1675–1680.

- [13] M. D. Kane, T. A. Jatkoe, C. R. Stumpf, J. Lu, J. D. Thomas, S. J. Madore, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 4552–4557.
- [14] R. D. Deegan, O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel, T. A. Witten, *Nature* **1997**, *389*, 827–829.
- [15] D. R. Call, D. P. Chandler, F. Brockman, *BioTechniques* **2001**, *30*, 368–379.
- [16] D. Rose in *Microarray Biochip Technology* (Hrsg.: M. Schena), Eaton, Natick, **2000**, S. 19–38.
- [17] T. Martinsky, P. Haje in *Microarray Biochip Technology* (Hrsg.: M. Schena), Eaton, Natick, **2000**, S. 201–220.
- [18] M. L. Mace, Jr., J. Montagu, S. D. Rose, G. McGuinness in *Microarray Biochip Technology* (Hrsg.: M. Schena), Eaton, Natick, **2000**, S. 39–64.
- [19] a) J. M. Shumaker, A. Metspalu, C. T. Caskey, *Laboratory Protocols for Mutation Detection* (Hrsg.: U. Landegren), Oxford University Press, Oxford, UK, **1996**, S. 93–95; b) A. G. Frutos, L. M. Smith, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10277–10282; c) S. Dubiley, E. Kirillov, A. Mirzabekov, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, e19; d) M. C. Pirrung, R. V. Connors, M. P. Montague-Smith, A. L. Odenbaugh, N. G. Walcott, J. J. Tollett, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1873; e) M. Kobayashi, E. Rappaport, A. Blasband, A. Semeraro, M. Sartore, S. Surrey, P. Fortina, *Mol. Cell Probes* **1995**, *9*, 175–182.
- [20] a) M. Eggers, M. Hogan, R. K. Reich, J. Lamture, D. Ehrlich, M. Hollis, B. Kosicki, T. Powdrill, K. Beattie, S. Smith, *Biotechniques* **1994**, *17*, 516–525; b) W. G. Beattie, L. Meng, S. L. Turner, R. S. Varma, D. D. Dao, K. L. Beattie, *Mol. Biotechnol.* **1995**, *4*, 213–225.
- [21] J. B. Lamture, K. L. Beattie, B. E. Burke, M. D. Eggers, D. J. Ehrlich, R. Fowler, M. A. Hollis, B. B. Kosicki, R. K. Reich, S. R. Smith, R. S. Varma, M. E. Hogan, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2121–2125.
- [22] Z. Guo, R. A. Guilfoyle, A. J. Thiel, R. Wang, L. M. Smith, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5456–5465.
- [23] a) C. E. Jordan, A. G. Frutos, A. J. Thiel, R. M. Corn, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4939–4947; b) A. J. Thiel, A. G. Frutos, C. E. Jordan, R. M. Corn, L. M. Smith, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4948–4956.
- [24] J. M. Brockman, A. G. Frutos, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8044–8051.
- [25] E. A. Smith, M. J. Wanat, Y. Cheng, S. V. P. Barreira, A. G. Frutos, R. M. Corn, *Langmuir* **2001**, *17*, 2502–2507.
- [26] a) T. Strother, W. Cai, X. Zhao, R. J. Hamers, L. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1205–1209; b) T. Strother, R. J. Hamers, L. M. Smith, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 3535–3541.
- [27] Y.-H. Rogers, P. Jiang-Baucom, Z.-J. Huang, V. Bogdanov, S. Anderson, M. T. Boyce-Jacino, *Anal. Biochem.* **1999**, *266*, 23–30.
- [28] M. C. Pirrung, J. D. Davis, A. L. Odenbaugh, *Langmuir* **2000**, *16*, 2185–2191.
- [29] X. Zhao, S. Nampalli, A. J. Serino, S. Kumar, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 955–959.
- [30] R. Sinibaldi, C. O'Connell, C. Seidel, H. Rodriguez in *Methods in molecular biology, Vol. 170: DNA arrays: methods and protocols* (Hrsg.: J. B. Rappal), Humana Press, Totowa, NJ, **2001**, S. 211–222.
- [31] Y. Belosludtsev, B. Iverson, S. Lemesko, R. Eggers, R. Wiese, S. Lee, T. Powdrill, M. Hogan, *Anal. Biochem.* **2001**, *292*, 250–256.
- [32] M. Beier, J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 1970–1977.
- [33] R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Wöhrle, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 686–694.
- [34] a) J. Zlatanova, A. Mirzabekov in *Methods in molecular biology, Vol. 170: DNA arrays: methods and protocols* (Hrsg.: J. B. Rappal), Humana Press, Totowa, NJ, **2001**, S. 17–38; b) G. Yershov, V. Barsky, A. Belgovskiy, E. Kirillov, E. Kreindlin, I. Ivanov, S. Parinov, D. Guschin, A. Drobishev, S. Dubiley, A. Mirzabekov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4913–4918.
- [35] D. Englert in *Microarray Biochip Technology* (Hrsg.: M. Schena), Eaton, Natick, **2000**, S. 231–246.
- [36] a) V. Benoit, A. Steel, M. Torres, Y.-Y. Yu, H. Yang, J. Cooper, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2412–2420; b) A. Steel, M. Torres, J. Hartwell, Y.-Y. Yu, N. Ting, G. Hoke, H. Yang in *Microarray Biochip Technology* (Hrsg.: M. Schena), Eaton, Natick, **2000**, S. 87–118.
- [37] T. Okamoto, T. Suzuki, N. Yamamoto, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 438–441.
- [38] P. Cooley, D. Hinson, H. J. Trost, B. Antohe, D. Wallace in *Methods in molecular biology, Vol. 170: DNA arrays: methods and protocols* (Hrsg.: J. B. Rappal), Humana Press, Totowa, NJ, **2001**, S. 117–129.
- [39] a) T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthelet, G. Bidan, R. Téoule, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2915–2921; b) T. Livache, B. Fouque, A. Roget, J. Marchand, G. Bidan, R. Téoule, G. Mathis, *Anal. Biochem.* **1998**, *255*, 188–194.
- [40] a) M. J. Heller, E. Tu, A. Holmsen, R. G. Sosnowski, J. O'Connell in *DNA Microarrays. A Practical Approach* (Hrsg.: M. Schena), Oxford Press, New York, **1999**, S. 167–185; b) P. N. Gilles, D. J. Wu, C. B. Foster, P. J. Dillon, S. J. Chanock, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 365–370; c) M. J. Heller, A. H. Forster, E. Tu, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 157–164.
- [41] a) M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science* **1995**, *270*, 467–470; b) D. A. Lashkari, J. L. DeRisi, J. H. McCusker, A. F. Namath, C. Gentile, S. Y. Hwang, P. O. Brown, R. W. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 13057–13062.
- [42] F. Diehl, S. Grahlmann, M. Beier, J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e38/1–e38/5.
- [43] I. Saito, H. Sugiyama, N. Furukawa, T. Matsuura, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3265–3268.
- [44] M. Schena, D. Shalon, R. Heller, A. Chai, P. O. Brown, R. W. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10614–10619.
- [45] N. Zammattéo, L. Jeanmart, S. Hamels, S. Courtois, P. Louette, L. Hevesi, J. Remacle, *Anal. Biochem.* **2000**, *280*, 143–150.
- [46] J. Worley, K. Bechtol, S. Penn, D. Roach, D. Hanzel, M. Trounstine, D. Barker in *Microarray Biochip Technology* (Hrsg.: M. Schena), Eaton, Natick, **2000**, S. 65–86.
- [47] M. Kwiatkowski, S. Fredriksson, A. Isaksson, M. Nilsson, U. Landegren, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4710–4714.
- [48] a) F. P. Wikman, M. L. Lu, T. Thykjaer, S. H. Olesen, L. D. Andersen, C. Cordon-Cardo, T. F. Orntoft, *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 1555–1561; b) S. A. Ahrendt, S. Halachmi, J. T. Chow, L. Wu, N. Halachmi, S. C. Yang, S. Wehage, J. Jen, D. Sidransky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7382–7387.
- [49] J. M. Shumaker, J. J. Tollett, K. J. Filbin, M. P. Montague-Smith, M. C. Pirrung, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2269.
- [50] G. McGall, J. A. Fianza in *Methods in molecular biology, Vol. 170: DNA arrays: methods and protocols* (Hrsg.: J. B. Rappal), Humana Press, Totowa, NJ, **2001**, S. 71–102.
- [51] A. C. Pease, D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Holmes, S. P. A. Fodor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5022–5026.
- [52] a) J. C. Schulhof, D. Molko, R. Teoule, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 397–416; b) Vu Huynh C. McCollum, K. Jacobson, P. Theisen, R. Vinayak, E. Spiess, A. Andrus, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7269–7272.
- [53] G. H. McGall, A. D. Barone, M. Diggelmann, S. P. A. Fodor, E. Gentalen, N. Ngo, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5081–5090.
- [54] J. Fianza, M. Glazer, D. Mutnick, G. McGall, C. Frank, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 533–538.
- [55] M. Jobs, S. Fredriksson, A. J. Brookes, U. Landegren, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 199–202.
- [56] M. C. Pirrung, L. Fallon, G. H. McGall, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 241–246.
- [57] A. D. Barone, J. E. Beecher, P. Bury, C. Chen, T. Doede, J. A. Fianza, G. H. McGall, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 525–531.
- [58] M. Beier, J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e11.
- [59] G. McGall, J. Labadie, P. Brock, G. Wallraff, T. Nguyen, W. Hinsberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13555–13560.
- [60] S. A. MacDonald, C. G. Willson, J. M. J. Frechet, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 151–158.
- [61] G. Wallraff, J. Labadie, P. Brock, T. Nguyen, T. Huynh, W. Hinsberg, G. McGall, *CHEMTECH* **1997**, *22*–32.
- [62] *Introduction to Microlithography* (Hrsg.: L. F. Thompson, C. G. Willson, M. J. Bowden), American Chemical Society, Washington, DC, **1994**.
- [63] M. C. Pirrung, L. Wang, M. P. Montague-Smith, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1105–1109.
- [64] S. Singh-Gasson, R. D. Green, Y. Yue, C. Nelson, F. Blattner, M. R. Sussman, F. Cerrina, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 974–978.
- [65] E. LeProust, J. P. Pellois, P. Yu, H. Zhang, X. Gao, O. Srinnavit, E. Gulari, Z. Zhou, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 349–354.
- [66] X. Gao, P. Yu, Y. E. LeProust, L. Sonigo, J. P. Pellois, H. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12698–12699.
- [67] T. P. Theriault, S. C. Winder, R. C. Gamble in *DNA Microarrays. A Practical Approach* (Hrsg.: M. Schena), Oxford Press, New York, **1999**, S. 101–119.

- [68] a) T. Brennan (Protogene), US Pat. 5,985,551, **1999**; b) J. H. Butler, M. Cronin, K. M. Anderson, G. M. Biddison, F. Chatelain, M. Cummer, D. J. Davi, L. Fisher, A. W. Frauendorf, F. W. Frueh, C. Gjerstad, T. F. Harper, S. D. Kernahan, D. Q. Long, M. Pho, J. A. Walker II, T. M. Brennan, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8887–8894.
- [69] T. R. Hughes, M. Mao, A. R. Jones, J. Burchard, M. J. Marton, K. W. Shannon, S. M. Lefkowitz, M. Ziman, J. M. Schelter, M. R. Meyer, S. Kobayashi, C. Davis, H. Dai, Y. D. He, S. B. Stephanians, G. Cavet, W. L. Walker, A. West, E. Coffey, D. D. Shoemaker, R. Stoughton, A. P. Blanchard, S. H. Friend, P. S. Linsley, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 342–347.
- [70] A. P. Blanchard (Rosetta), US Pat. 6,028,189, **2000**.
- [71] R. S. Matson, J. Rampal, S. L. Pentoney, Jr., P. D. Anderson, P. Coassin, *Anal. Biochem.* **1995**, *224*, 110–116.
- [72] J. K. Elder, M. Johnson, N. Milner, K. U. Mir, M. Sohail, E. M. Southern in *DNA Microarrays. A Practical Approach* (Hrsg.: M. Schena), Oxford Press, New York, **1999**, S. 77–99.
- [73] a) S. Case-Green, C. Pritchard, E. M. Southern in *DNA Microarrays. A Practical Approach* (Hrsg.: M. Schena), Oxford Press, New York, **1999**, S. 61–76; b) M. Sohail, E. M. Southern in *Methods in molecular biology, Vol. 170: DNA arrays: methods and protocols* (Hrsg.: J. B. Rampal), Humana Press, Totowa, NJ, **2001**, S. 181–199.
- [74] A. Jung, I. Stemmler, A. Brecht, G. Gauglitz, *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, *371*, 128–136.
- [75] O. Yogi, T. Kawakami, M. Yamauchi, J. Y. Ye, M. Ishikawa, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1896–1902.
-