

SNP und CAPS Marker

Entwicklung mit LabChip 90-Mikrofluidik und Anwendung der HTS-Genotypisierung mit Array-On MIA Chips

Array-On bietet sowohl Service-Analysen im Bereich SNPs und Fragmentanalysen, sowie fertige Produkte zur diagnostischen SNP-Analyse im Humanbereich (z. B. relevante Gene für Entzündungsprozesse, Medikation bei Depression u.a.) aber auch Gentests und GvO-Tests in Pflanzen. Im Zuge der Entwicklung neuer SNP-Marker (single nucleotide polymorphism) wird bei Array-On durch LabChip 90-Mikrofluidik ein Brückenschlag zur anschließenden Anwendung neuartiger DNA-Chip-basierter Hochdurchsatzsysteme erleichtert.

Methodik

Cleaved Amplified Polymorphic Sites (CAPS) stellen eine einfache Methode zum Nachweis von Mutationen wie Indels oder SNPs dar. PCR Fragmente werden mit Restriktionsendonukleasen zerlegt und die charakteristischen Produkte elektrophoretisch nachgewiesen. Längenunterschiede der Restriktionsprodukte zeigen Sequenzvarianten in PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten an. Die Methode ist vor allem verbreitet in der Tier- und Pflanzenzüchtung aber auch im Bereich der Humanmedizin

Hierbei ist es sehr sinnvoll über ein ebenso einfaches wie präzises System zu verfügen, das es, anders als herkömmliche Elektrophoresesysteme, erlaubt auch geringste Größenunterschiede zwischen Fragmenten zweier Proben nachzuweisen. Durch eine bessere praktische Auflösung von Größendifferenzen (Unterschiede von wenigen Basen sind sichtbar) und den Nachweis auch geringster DNA-Mengen (10 pg) wird das Spektrum der analysierbaren Fragmente und damit der als kodominante CAPS-Marker analysierbaren Sequenzvarianten wesentlich erhöht. So konnten auch Enzymschnittstellen nahe an der Primerbindestelle der Fragmente und auch solche Enzymkombinationen, bei denen nur kleine Stücke, bis hinunter zu etwa 20 Basenpaaren, abgetrennt werden, mit diesem Mikrofluidik-Chip noch nachgewiesen werden. Auch ist der Ablauf gegenüber herkömmlichen Elektrophoreseverfahren beschleunigt. Insgesamt liefert die Mikrofluidik solche umfangreichen Laboranalysen auf sehr kleinem Raum in einem einzigen Chip und gleichzeitig automatisiert mit off-hands Analytik von 384 Proben (ca. 30 s pro Sample) bei der hier verwendeten Standard-Ausführung. Im Folgenden wird ein Beispiel für die Entwicklung von CAPS Markern und ein zweites für die Anwendung solcher Marker geliefert – beides mithilfe einer Analytik basierend auf Mikrofluidik im LabChip 90.

Markerentwicklung zur Genotypisierung
Bei dem ersten Beispiel geht es zunächst um eine Entwicklung von SNP-Markern für die Unterscheidung von gelagerten Pflanzensorten in europäischen Genbanken. Interessant ist dies für Hafer, Weizen und Gemüse wie z. B. Küchenzwiebeln. Hier gilt es zahllose Sorten zu unterscheiden, die morphologisch nur schwer und chemisch nicht sicher zu trennen sind. Andere Markersysteme versagen hier ob der auch sehr geringen molekulargenetischen Unterschiede in vegetativ vermehrten Nutzpflanzen. Dagegen finden sich fast immer die in vielen Organismen weit verbreiteten SNPs. Allerdings sind die üblichen Methoden für den SNP-Nachweis nicht eben günstig. Nicht so die CAPS, die hier auch in Multiplexen ausgeführt werden: PCR-Produkte polymorpher Loci werden mit gleich mehreren (in diesem Fall 5) Enzymen bearbeitet und die resultierenden Fragmente mit dem Labchip 90 aufgetrennt. Mehrere Enzyme erhöhen die Wahrscheinlichkeit dafür, einen Treffer zu erzielen, d. h. ein SNP verändert eine Enzymschnittstelle, so dass ein Schnitt entsteht oder verschwindet, worauf sich das Muster ändert. In diesem Beispiel ging es darum unterschiedliche Linien zweier Sorten zu typisieren. Neben den sortentypischen Mustern „598“ und „732“ zeigen sich auch noch kleine Unterschiede (siehe *) zwischen den Linien aus der *in vitro*-Kultur einer Akzession (Spuren 1 und 2 in Abb. 1).

So lassen sich auch sehr ähnliche, entwicklungsgeschichtlich vorwiegend vegetativ vermehrte Organismen typisieren und klassifizieren. Sollte eine Enzymkombination nicht erfolgreich sein, werden einfach neue Enzymsets getestet, bis für die Fragestellung ausreichend viele Polymorphismen gefunden wurden. Hierbei trägt die präzise Analytik der Mikrofluidik von Caliper wesentlich zu einer verbesserten Rate

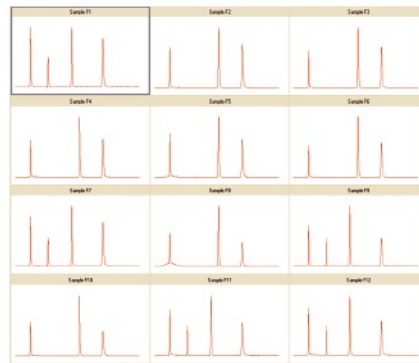
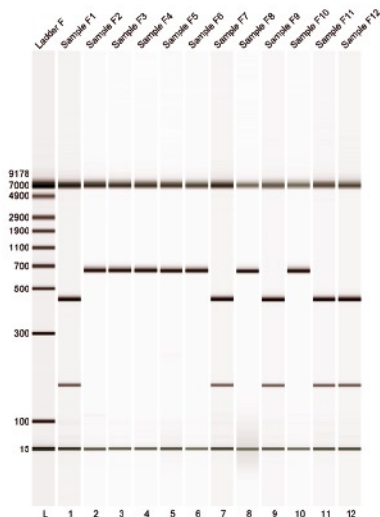


bei, da kaum eine Differenz im Muster übersehen wird. Auch lassen sich die weitergehenden Analysemöglichkeiten nutzen, wenn bei einer automatisierten Musterauswertung eine bestimmte Fragmentgröße in der gelieferten Tabelle erkannt werden soll. Es gibt neben der Gerätebedienungssoftware, die schon solche Tabellen und Grafiken in vielen wählbaren Zusammenstellungen und Formaten liefert, auch eine Software (DataViewer) als Zubehör, welche weitergehende Auswertungen, wie z. B. Rekombination von Analysen über verschiedene analysierte Platten hinweg, selbstständig übernehmen kann. Alternativ zur Anzeige des so genannten virtuellen Gels ist auch die Darstellung als Peak-Chromatogramm möglich. Mit jeder Probe werden Standard-Fragmente zur Quantifizierung und Größenbestimmung mit ausgewertet (Abb. 2, grüne Markierungen 15 und 7.000 Basenpaare). Zusätzlich wird alle 12 Proben eine neue Fragmentleiter (Abb. 2, Spur L) erstellt, welche die Größenbestimmung weiter präzisiert.

Anwendungsbeispiel: Hochdurchsatzkartierung

Bei dem zweiten Beispiel geht es um eine Kartierung von CAPS Markern eines wide-crosses von Kichererbsen (*Cicer*

Virtual Gel and Chromatogram



Consumption: 100 nl

Abb. 2

Abb. 1: Pentaplex-CAPS. Man sieht neben den sortentypischen komplexen Mustern „A“ und „B“ auch noch Unterschiede zwischen den Linien aus der *in vitro*-Kultur einer Akzession (Spur 3 und 4).

Abb. 2: Einzel-CAPS-Analyse in einer kartierenden Population von Kichererbsenpflanzen. Spuren 1 und 2 zeigen die Eltern, die übrigen Spuren homozygote Nachkommen.

arietinum × *Cicer reticulatum*), einer wichtigen Zwischenfrucht v.a. in semiariden Gebieten. Hierbei sieht man deutlich entweder das Originalfragment ohne Schnittstelle (Abb. 2: 700 Basenpaare, Spuren 2–6, 8 und 10) oder die beiden Schnittfragmente (Abb. 2: 250 und 450 Basenpaare, Spuren 1, 7, 9, 11 und 12) bei Genotypen mit vorhandener Restriktionsschnittstelle. Die verwendeten Marker sind von der Genomsequenz der Modellleguminose *Medicago truncatula* (gestutzter Schneckenklee) abgeleitet.

Hier wurden durch vergleichende Sequenzierung, Ermittlung der Sequenzunterschiede in den Eltern und Design geeigneter Assaysysteme einzelne SNP-Loci entwickelt, die, einmal entwickelt, nicht nur mit CAPS sondern auch besser für die Hochdurchsatz-geeigneten Methoden analysiert werden könnten. In diesem Zusammenhang bieten sich besonders die bei Array-On entwickelten Chip-basierten Hochdurchsatzsysteme zur SNP Analyse an. Es handelt sich hierbei um Systeme, die auf Festphasen-Primerextension basieren. Bei diesen Verfahren (MIA, Multiple Individual Array) werden PCR-Produkte der SNP-Loci einzelsträngig gemacht und mit einem Oligonukleotid hybridisiert, welches der SNP-Base auf dem DNA-Strang direkt benachbart ist. Knackpunkt ist, dass nun erst die Hybride auf dem Chip immobilisiert werden. Dadurch

wird die parallele Analyse vieler Individuen (z.B. Nachkommen bei dieser Kartierung) auf einem Chip ermöglicht und gleichzeitig die Analyse durch Vermeiden von Kreuzkontamination sehr sicher gemacht. Nach Durchführung einer kurzen enzymatischen Reaktion mit einer Polymerase (single base extension) auf dem Chip-System mit zwei Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden, kann man die infrage kommenden Genotypen der SNPs ohne weiteren Aufwand direkt anhand der Farbe der Test-Spots ablesen. Es wird also genau die interessierende Base – und nur die jeweils interessierende Base – auf dem Chip identifiziert.

Wissenschaftlicher Hintergrund ist ein Projekt zur Erforschung der Syntanie in Nutz-Leguminosen, ähnlich wie es anfangs mit Tomate und Kartoffel (beides Nachtschattengewächse) durchgeführt wurde, um die gemeinsame Phylogenie und darauf basierend Auswirkungen für Pathogenresistenzen oder Klimaanpassungen zu erforschen. Es wird versucht von einer Modell-Art (*M. truncatula*) mit gut erforschtem Genom und bekannten Genfunktionen auf syntanisch verwandte Bereiche in Nutzpflanzengenomen zu schließen und so Informationen über z.B. agronomisch relevante Genfunktionen in verwandten Nutzpflanzen zu erhalten.

Im Übrigen bietet Array-On auch Auftragsanalysen (DNA-Fragmente oder

Fragmentgemische) im LabChip 90 als Dienstleistung an.

Ihre Anfragen hierzu senden Sie bitte an info@array-on.com. Sie können sich auch gerne an die unten angegebene Kontaktadresse wenden.

Referenzen

- [1] Geistlinger J. und Ahnert P.: Large-scale Detection of Genetic Variation: The Key to Personalized Medicine; (ed.) Jörg Knäblein, Schering AG, Berlin, Modern Biopharmaceuticals, Vol.1 pp.71–95. WileyVCH (Weinheim), 2005, ISBN J-527-J1184-X
- [2] Geistlinger J. *et al.*: BIOSpektrum, Elsevier 5, 671–674 (2005)
- [3] Bonierbale M.W. *et al.*: Genetics 120, 1095–1103 (1988)

Kontakt:

Dr. Dirk Fischer
Dr. Jörg Geistlinger
Array-On GmbH
Gatersleben
info@array-on.com
www.array-on.com

Dr. Holger Schulz
Caliper Life Sciences GmbH
Rüsselsheim
germany@calipers.com